

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 3 月 17 日 (17.03.2005)

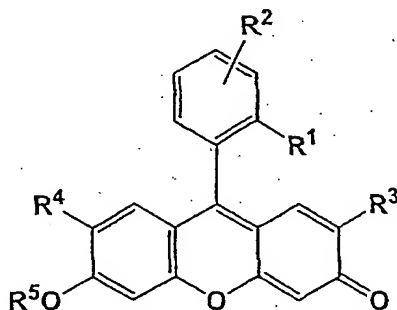
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/024049 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/34 // G01N 21/64, 21/78 (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/013185
- (22) 国際出願日: 2004 年 9 月 3 日 (03.09.2004) (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-314041 2003 年 9 月 5 日 (05.09.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋 3 丁目 1 3 番 5 号 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 長野 哲雄 (NAGANO, Tetsuo) [JP/JP]; 〒1670032 東京都杉並区天沼 1-28-15 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 神谷 真子 (KAMIYA, Mako) [JP/JP]; 〒3050031 茨城県つくば市吾妻 2-823-3 Ibaraki (JP). 浦野 泰照 (URANO, Yasuteru) [JP/JP]; 〒2130013 神奈川県川崎市高津区末長 498 ドミール梶ヶ谷 204 Kanagawa (JP).
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW). ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
一 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FLUORESCENT PROBE

(54) 発明の名称: 蛍光プローブ



(I)

(57) Abstract: A fluorescent probe which is represented by the following formula (I): (I) wherein R¹ represents hydrogen, carboxy, or a monovalent substituent other than sulfo; R² represents hydrogen or a monovalent substituent; R³ and R⁴ each independently represents hydrogen or halogeno; and R⁵ represents a monovalent group which is cleaved upon contact with a substance to be detected; provided that a combination of R¹ and R² is selected so that the

benzene ring having R¹ and R² bonded thereto has such an oxidation potential that (1) before the cleavage, the compound represented by the formula (I) has substantially no fluorescence and (2) after the cleavage, the resultant compound formed from the compound represented by the formula (I) is substantially highly fluorescent.

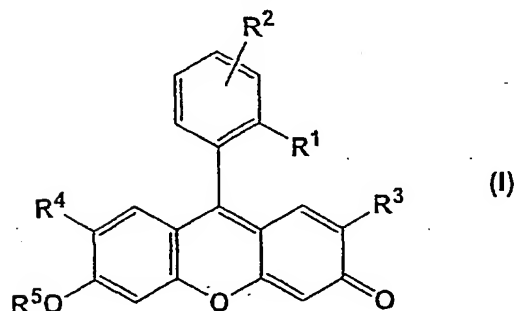
/続案有/

BEST AVAILABLE COPY

WO 2005/024049 A1

(57) 要約:

蛍光プローブであって、下記の式 (I) :



(式中、 R^1 は水素原子、カルボキシル基、又はスルホン酸基以外の一価の置換基を示し； R^2 は水素原子又は一価の置換基を示し； R^3 及び R^4 はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^5 は測定対象物質との接触により切断される一価の基を示し、ただし、 R^1 及び R^2 の組み合わせは、それらが結合するベンゼン環の酸化電位が、(1)上記切断の前には、式 (I) で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、かつ(2)上記切断の後には、式 (I) で表される化合物に由来する切断後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように選ばれる。)で表される蛍光プローブ。

明 細 書

蛍光プローブ

技術分野

本発明は蛍光プローブに関する。より具体的には、酵素などの標的物質を捕捉して蛍光を発する蛍光プローブに関するものである。

背景技術

フルオレセインは19世紀から知られる蛍光物質で、水溶液中で500 nm付近で励起可能であり、量子収率も高いことから蛍光プローブの母核として汎用されている。例えば、一酸化窒素の蛍光プローブ（特開平10-226688号公報）、亜鉛の蛍光プローブ（国際公開W0 01/62755）などの母核に利用されている。

フルオレセインのカルボキシル基を水素原子に置き換えた6-ヒドロキシ-9-フェニルフルオロンは蛍光量子収率が低くなるため、このカルボキシル基はフルオレセインの蛍光団としての特性に役割を持つと考えられてきた（Lindqvist, L., et al., J. Chem. Phys., 44, 1711-12, 1966）。このような理由から、従来提案されているフルオレセイン誘導体ではフルオレセインの蛍光特性を損なわないようにこのカルボキシル基が保存されており、カルボキシル基を他の官能基に変換した化合物はほとんど知られていない。

発明の開示

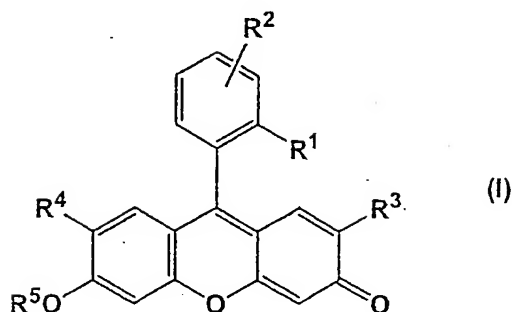
本発明の課題は、蛍光特性に優れた蛍光プローブを提供することにある。本発明者らはフルオレセインの蛍光物質としての性質を種々検討するうち、その蛍光特性はもっぱら三環のキサンテン骨格に基づくものであり、キサンテン環の9一位に結合する2-カルボキシフェニル基は蛍光特性に実質的に何の影響も与えていないとの結論に至った。そこで、本発明者らは、2-カルボキシフェニル基の

カルボキシル基を水素原子以外の置換基、例えばメチル基又はメトキシ基などに置換した化合物の蛍光特性を確認したところ、驚くべきことに、これらの化合物がフルオレセインとほぼ同等の強度の蛍光量子収率を有しており、励起波長及び蛍光波長もほぼ同じであることを発見した。

これらの事実、及びカルボキシル基を水素原子に置き換えた6-ヒドロキシ-9-フェニルフルオロンでは蛍光量子収率が低下する事実から、本発明者らはフルオレセインにおけるカルボキシル基の役割がキサントレン環とベンゼン環部の炭素-炭素単結合による自由回転を防ぐことにあり、これによって励起状態の蛍光団が発光過程を経ずに失活する経路を妨げることにありと結論した。さらに、本発明者らは上記の知見を基にして高い蛍光特性を有する蛍光プローブを創出すべく研究を行った結果、キサントレン環の9-位に結合するフェニル基の電子密度が十分に高い化合物では実質的に非蛍光性であり、該フェニル基の電子密度が十分に低い化合物では高い蛍光性を有すること、及びフルオレセインのカルボキシル基を他の官能基に変換して該フェニル基の電子密度を調節することにより、所望の蛍光特性を有する蛍光プローブを合理的に設計できることを見出し、この発明について特許出願した (PCT/JP03/8585)。

本発明は上記の課題を解決するための別の手段を提供すべくさらに研究を進めた結果、キサントレン環のヒドロキシル基がプロトン化されている場合と脱プロトン化されている場合とを比較すると、両方でキサントレン環の還元電位に大きな差が生じていること、及びこの還元電位差を蛍光のON/OFFスイッチとして利用すべくベンゼン環部分（電子ドナー部位）の電子密度を適宜選択することにより、キサントレン環部位に測定対象物質との反応部位を導入した新規蛍光プローブを提供できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明は、蛍光プローブであって、下記の式 (I)：



(式中、 R^1 は水素原子、カルボキシル基、又はスルホン酸基以外の一価の置換基を示し； R^2 は水素原子又は一価の置換基を示し； R^3 及び R^4 はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^5 は測定対象物質との接触により切断される一価の基を示し、

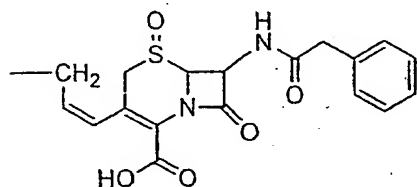
ただし、 R^1 及び R^2 の組み合わせは、それらが結合するベンゼン環の酸化電位が、(1)上記切断の前には、式(I)で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、かつ

(2)上記切断の後には、式(I)で表される化合物に由来する切断後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように選ばれる。)

で表される蛍光プローブを提供するものである。

この発明の好ましい態様によれば、該ベンゼン環の酸化電位が1.55V～1.75Vになるように R^1 及び R^2 の組み合わせが選ばれる上記の蛍光プローブ；該ベンゼン環の酸化電位が1.60V～1.70Vの範囲となるように R^1 及び R^2 の組み合わせが選ばれる上記の蛍光プローブが提供される。本発明のさらに好ましい態様によれば、 R^3 及び R^4 が水素原子である上記の蛍光プローブ； R^1 が低級アルキル基であり、 R^2 が低級アルコキシ基である上記の蛍光プローブ； R^1 が低級アルキル基であり、 R^2 がキサントン環残基に対してパラ位の低級アルコキシ基である上記の蛍光プローブ；上記の切断が加水分解により生じる上記の蛍光プローブ；測定対象物質が加水分解酵素である上記の蛍光プローブ； R^5 がリン酸エステル加水分解酵素により切断されるホスホノ基である上記の蛍光プローブ； R^5 が糖加水分解酵素により切断される糖誘導体の残基である上記の蛍光プ

ローブ； R^5 が β -ガラクトピラノシル基である上記の蛍光プローブ； R^5 が β -ガラクトピラノシル基であり、 R^2 がカルボキシ置換アルコキシ基又は4-カルボキシブトキシ基である上記の蛍光プローブ； R^5 が β -ラクタマーゼによる切断される環状アミドを含む基である上記の蛍光プローブ； β -ラクタマーゼによる切断される環状アミドを含む基が下記の式で表される基である上記の蛍光プローブ；



が提供される。

別の観点からは、上記の一般式 (I) (式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 はそれぞれ上記の定義と同義である) で表される蛍光プローブの設計方法であって、 R^1 及び R^2 の組み合わせとして、それらが結合するベンゼン環の酸化電位が、(1)上記切断の前には、式 (I) で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、かつ

(2)上記切断の後には、式 (I) で表される化合物に由来する切断後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように

組み合わせを選択する工程を含む方法が本発明により提供される。さらに、上記の設計方法により得られた蛍光プローブも本発明により提供される。

図面の簡単な説明

第1図は、フルオレセインのカルボキシル基をアルキル基又はアルコキシ基に変換した誘導体 (化合物1～8) について、各化合物の蛍光量子収率とPETドナー部分であるベンゼン環部の酸化電位との関係を示した図である。

第2図は、フルオレセインのカルボキシル基をアルキル基又はアルコキシ基に変換した誘導体 (化合物1～8) について、各化合物の蛍光量子収率とPETド

ナー部分であるベンゼン環部のHOMOエネルギーレベルとの関係を示した図である。

第3図は、PETの概念図及びフルオレセインについてPETドナー部と蛍光団の2つの部位を示した図である。

第4図は、本発明蛍光プローブAと β -ガラクトシダーゼとの反応により生じる蛍光を経時的に示した図である。図中右側のグラフは反応当初の15分間の蛍光強度変化を拡大して示したものである。

第5図は、本発明蛍光プローブAを用いて細胞中の β -ガラクトシダーゼの測定を行った結果を示した写真である。左側はlacZ陽性細胞の結果を示し、右側はLacZ陰性細胞の結果を示す。

第6図は、化合物11 (TG-Phos) をアルカリフォスファターゼに接触させた場合の蛍光強度の経時変化を示した図である。

第7図は、TG-Phosのアルカリフォスファターゼによる反応前後の蛍光スペクトル変化(a)及び吸収スペクトル(b)変化を示した図である。

第8図は、例9で得た2-Me 4-O(CH₂)₄COOAM TG β -Gal を β -ガラクトシダーゼに接触させた場合の蛍光強度の経時変化を示した図である。

第9図は、2-Me 4-O(CH₂)₄COOAM TG β -Gal のを β -ガラクトシダーゼによる反応前後の蛍光スペクトル変化(a)及び吸収スペクトル(b)変化を示した図である。

第10図は、2-Me 4-O(CH₂)₄COOAM TG- β Gal を用いた生細胞系での β -ガラクトシダーゼ蛍光アッセイの結果を示した写真である。

第11図は、TG- β Lacを用いたインビトロ β -ラクタマーゼ蛍光アッセイの結果を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明により提供される式(I)で表される蛍光プローブは、測定対象物質との接触により切断されて蛍光性の化合物(上記式(I)においてR⁵が切断され、ヒドロキシ基がアニオン状態で存在する化合物に相当する)を生成することがで

き、測定対象物質の測定のための蛍光プローブとして用いられる。測定対象物質の種類は特に限定されず、酵素、金属イオン（例えば、ナトリウムイオンやリチウムイオンなどのアルカリ金属イオン、カルシウムイオンなどのアルカリ土類金属イオン、マグネシウムイオン、亜鉛イオンなど）、非金属イオン（炭酸イオンなど）、活性酸素種（例えば、一酸化窒素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、及びスーパーオキシドなど）などのいずれであってもよいが、好ましくは酵素である。酵素としては、例えば、還元酵素、酸化酵素、加水分解酵素などを挙げることができる。例えば、 β -ラクタマーゼ、チトクロームP 450酸化酵素、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -ヘキソサミニダーゼ、ラクターゼ、アルカリホスファターゼなどを挙げることができるが、これらに限定されることはない。酵素のうち、特に加水分解酵素が好ましい。加水分解酵素の典型例として、例えば β -ガラクトシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、又はアルカリホスファターゼなどを挙げることができるが、加水分解酵素は上記のものに限定されるわけではない。

本発明の蛍光プローブは、従来、フルオレセインを母核として種々提案されている各種測定対象物の測定のための蛍光プローブにおいて、キサンテン環の9-位に結合する2-カルボキシフェニル基のカルボキシル基を水素原子、スルホン酸基以外の一価の置換基に変換し、かつ測定対象物質との反応部位をキサンテン骨格のヒドロキシル基としたことを特徴としている。本発明の蛍光プローブはそれ自体は実質的に無蛍光性であるが、測定対象物質との接触により切断され、実質的に高い蛍光性を有する化合物を生成することを特徴としている。

R^1 は水素原子、カルボキシル基、又はスルホン酸基以外の一価の置換基を示す。 R^2 は水素原子又は一価の置換基を示す。これらの基が示す一価の置換基の種類は特に限定されないが、例えば、 R^1 としてはアルキル基が好ましく、 R^2 としてはアルコキシ基が好ましい。 R^1 が示すアルキル基又は R^2 が示すアルコキシ基は、1個又は2個以上の任意の置換基を有していてもよい。 R^2 が示す置換アルコキシ基としては、例えば、カルボキシル置換 C_{1-6} アルコキシ基又はアルコキ

シカルボニル置換 C_{1-6} アルコキシ基などが挙げられる。本明細書において、「アルキル基」又はアルキル部分を含む置換基（例えばアルコキシ基など）のアルキル部分は、例えば、炭素数 1～12 個、好ましくは炭素数 1～6 個、好ましくは炭素数 1～4 個の直鎖、分枝鎖、環状、又はそれらの組み合わせからなるアルキル基を意味している。より具体的には、アルキル基として低級アルキル基（炭素数 1～6 個のアルキル基）が好ましい。低級アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、イソブチル基、*tert*-ブチル基、シクロプロピルメチル基、*n*-ペンチル基、*n*-ヘキシル基などを挙げることができる。 R^1 としては低級アルキル基がより好ましく、 R^2 としては低級アルコキシ基がより好ましい。特に好ましいのは、 R^1 がメチル基であり、 R^2 がメトキシ基である化合物である。また、 R^2 がモノカルボキシ基置換 C_{1-6} アルコキシ基又はモノアルコキシカルボニル置換 C_{1-6} アルコキシ基である化合物も好ましい。特に好ましいのは R^2 が 4-カルボキシブトキシ基又は 4-アセトキシメチルオキシカルボニルブトキシ基である化合物である。 R^2 が 4-アセトキシメチルオキシカルボニルブトキシ基である本発明の蛍光プローブは高い脂溶性により細胞内に効率良く取り込まれ、かつ、細胞内に取り込まれると細胞内に存在するエステラーゼにより 4-アセトキシメチルオキシカルボニルブトキシ基が加水分解を受け水溶性の高い蛍光プローブに変換され細胞内に滞留しやすくなる優れた特性を有しており、細胞内をイメージングする用途の蛍光プローブとして大変適している。ベンゼン環上の R^2 の置換位置は特に限定されないが、キサンテン環の残基の結合位置に対してパラ位であることが好ましい。 R^1 及び R^2 が結合するベンゼン環上には、これらの置換基以外に任意の置換基が存在していてもよい。

本明細書においてハロゲン原子という場合には、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよく、好ましくはフッ素原子、塩素原子、又は臭素原子である。 R^3 及び R^4 が示すハロゲン原子としては塩素原子又はフッ素原子が好ましい。 R^3 及び R^4 がそれぞれ独立に水素原子、塩素原子、又はフッ素

原子であることが好ましい。R⁵は測定対象物質との組み合わせにより容易に切断されるように適宜選択することができるが、例えば、糖加水分解酵素を測定対象物質として用いる場合には、R⁵はとしてその酵素の基質となる糖化合物の残基を用いることができる。糖化合物が有するヒドロキシ基やアミノ基などの官能基は必要に応じて適宜の保護基で保護されていてもよい。このような保護基を有する化合物もすべて本発明の範囲に包含される。

本発明の蛍光プローブにおいて、R¹及びR²の組み合わせは、測定対象物質によるR⁵の切断前には、式(I)で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように選択され、かつ(2)測定対象物質によるR⁵の切断後には、式(I)で表される化合物に由来する切断後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように選択される。

R¹及びR²の組み合わせの選択に際して、それらが結合するベンゼン環の電子密度の情報を利用することができる。電子密度の情報は、例えば該ベンゼン環の酸化電位を量子化学的手法に従って計算することにより容易に入手することができる。該ベンゼン環の酸化電位が低くなることは該ベンゼン環の電子密度が上昇することを意味しており、これはHOMO軌道エネルギーが高くなることに対応している。例えば、該ベンゼン環部位のHOMOエネルギーを密度汎関数法(B3LYP/6-31G(d))により求めることができる。なお、本明細書中に記載された酸化電位はすべて飽和カロメロ電極(SCE)を対照に記述しており、硝酸銀電極(Ag/Ag⁺)を参照電極とした場合の値とは約0.24V基準が異なっている。

本明細書の実施例の例2に具体的に示されているように、一般式(I)で表される化合物においてR⁵が水素原子である化合物は、pH13のアルカリ水溶液中ないし中性水溶液中では、キサンテン環のヒドロキシ基のプロトンが脱離してアニオンになっているが(すなわち該ヒドロキシル基が-O⁻となっている)、例えば、この条件下において該ベンゼン環の酸化電位が1.20V以下の化合物は実質的に無蛍光性であり、該ベンゼン環の酸化電位が1.60V以上では実質的に強い蛍光性の化合物となる場合がある。また、pH3.4の酸性条件下では、

該ヒドロキシル基にプロトンが存在する状態になっているが（すなわち該ヒドロキシル基が -OH となっている）、例えば、該ベンゼン環の酸化電位が 1.60 V 以下の化合物は実質的に無蛍光性であり、該ベンゼン環の酸化電位が 1.90 V よりも大きい場合は実質的に強い蛍光性の化合物となる場合がある。この関係を図示したのが第1図である。この第1図には、 R^1 及び R^2 として種々の組み合わせを有する化合物における該ベンゼン環の酸化電位の変化と、それらの化合物の蛍光量子収率を示した。 $\text{pH}13$ の曲線は脱プロトン化された化合物の酸化電位と蛍光量子収率との関係、 $\text{pH}3.4$ の場合はプロトン化された化合物の酸化電位と蛍光量子収率との結果を示している。

該ヒドロキシル基にプロトンが存在する化合物と、 R^5 が例えばアルキル基などの化合物とを比較した場合、該ベンゼン環部分の酸化電位は実質的に同一であることが実験的に確認されており、 R^5 の切断が生じる前の化合物における該ベンゼン環の酸化電位は、一般式（I）で表される化合物において R^5 が水素原子である化合物を $\text{pH}3.4$ の酸性条件下に置いた場合の該ベンゼン環の酸化電位で代用することができる。従って、該ベンゼン環の酸化電位を指標として R^1 及び R^2 の好ましい組み合わせを選択するためには、例えば第1図を参照しつつ、一般式（I）で表される化合物において R^5 が水素原子である化合物について、 $\text{pH}3.4$ における蛍光量子収率と $\text{pH}13$ における蛍光量子収率との差が最大になるように選択すればよい。より具体的には、第1図において、該ベンゼン環の酸化電位が $1.55\text{ V} \sim 1.75\text{ V}$ になるように R^1 及び R^2 の組み合わせを選ぶことが好ましく、該ベンゼン環の酸化電位が $1.60\text{ V} \sim 1.70\text{ V}$ の範囲となるように R^1 及び R^2 の組み合わせを選ぶことがより好ましい。最も好ましいのは、該ベンゼン環の酸化電位が 1.65 V 程度となるように R^1 及び R^2 の組み合わせを選ぶことである。なお、 R^1 及び R^2 が結合するベンゼン環上に R^1 及び R^2 以外の1又は2以上の置換基が存在する場合には、 R^1 及び R^2 並びにそ（れら）の置換基を全て含めた状態で該ベンゼン環の酸化電位を上記の範囲となるように選択することが好ましい。

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、本発明者らが見出した上記の知見はPET (Photoinduced Electron Transfer: 光誘起電子移動) により説明できる。PETとは蛍光消光の1つの方法であり、励起光照射により生成する1重項励起蛍光団が蛍光を発して基底状態に戻る速度よりも速く、近隣の電子供与部位(PETドナー)から電子移動が起き、蛍光消光が起こるというものである。式(I)で表される化合物について、蛍光団として作用するキサンテン環部位と、蛍光を消光する部位であるベンゼン環部位(PETドナー)とに分割して考えると、ベンゼン環側の酸化電位が低い(すなわち電子密度が高く、HOMOエネルギーが高い)とPETによりキサンテン環由来の蛍光が消光する。

蛍光プローブとしては、測定対象物質による R^5 の切断前には実質的に蛍光がなく、測定対象物質による R^5 の切断後には実質的に強い蛍光性物質に変化する性質を有することが求められるので、蛍光強度の変化が大きいものを好適なプローブとして選択することが望ましい。例えば、測定対象物質による R^5 の切断前にはPETにより蛍光が消失しており、測定対象物質による R^5 の切断後には実質的にPETが生じないようにプローブを設計することができる。本発明の蛍光プローブ設計法では、ベンゼン環側の酸化電位を固定しておき、 R^5 の切断の前後でキサンテン環に生じる還元電位の変化を利用して、 R^5 の切断の前にはPETにより蛍光が消光しており、切断の後にはPETに障害が生じて切断後の化合物が強い蛍光を発するように蛍光プローブを設計することができる。

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性、又は診断などの目的で行われる測定、検査、検出などを含めて、最も広義に解釈しなければならない。本発明の蛍光プローブを用いた測定対象物の測定方法は、一般的には、

(a) 上記式(I)で表される化合物と測定対象物質とを接触させて R^5 を切断させる工程、及び(b)上記工程(a)で生成した化合物(R^5 が切断された化合物に相当する)の蛍光を測定する工程を含んでいる。例えば、生理食塩水や緩衝液などの水性媒体、又はエタノール、アセトン、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミドなどの水混合性の有機溶媒と水性媒体と

の混合物などに本発明の蛍光プローブ又はその塩を溶解し、細胞や組織を含む適切な緩衝液中にこの溶液を添加して、蛍光スペクトルを測定すればよい。

測定対象物質により R^5 が切断された後の化合物の蛍光の測定は通常の方法で行うことができ、インビトロで蛍光スペクトルを測定する方法や、バイオイメージングの手法を用いてインビボで蛍光スペクトルを測定する方法などを採用することができる。例えば、定量を行う場合には、常法に従って予め検量線を作成しておくことが望ましい。

本発明の蛍光プローブとしては、上記式 (I) で表される化合物のほか、その塩を用いてもよい。塩の種類は特に限定されないが、例えば、酸付加塩としては塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩などの鉱酸塩、又はメタンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、シュウ酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩などを挙げることができ、塩基付加塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などの金属塩、アンモニウム塩、又はトリエチルアミン塩などの有機アミン塩などを挙げることができる。これらのほか、グリシンなどのアミノ酸との塩を形成する場合もある。必要に応じて、試薬の調製に通常用いられる添加剤を配合して組成物として用いてもよい。例えば、生理的環境で試薬を用いるための添加剤として、溶解補助剤、pH 調節剤、緩衝剤、等張化剤などの添加剤を用いることができ、これらの配合量は当業者に適宜選択可能である。これらの組成物は、粉末形態の混合物、凍結乾燥物、顆粒剤、錠剤、液剤など適宜の形態の組成物として提供される。

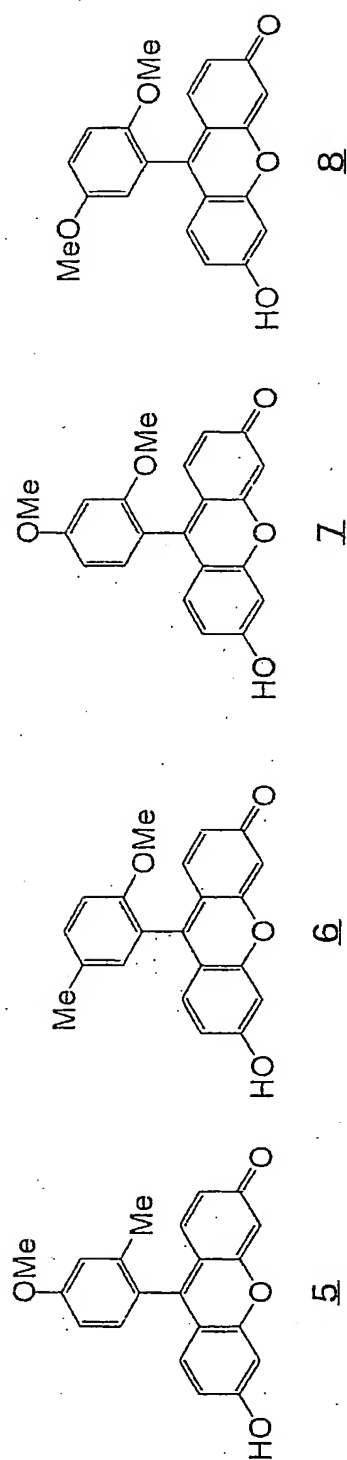
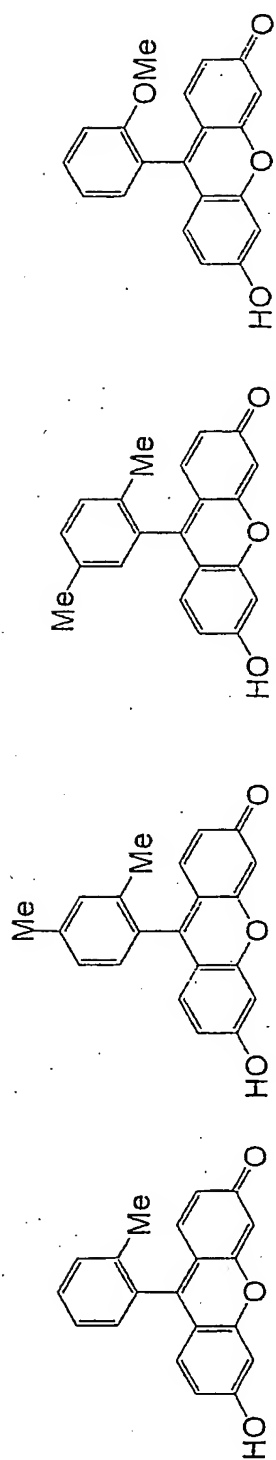
実施例

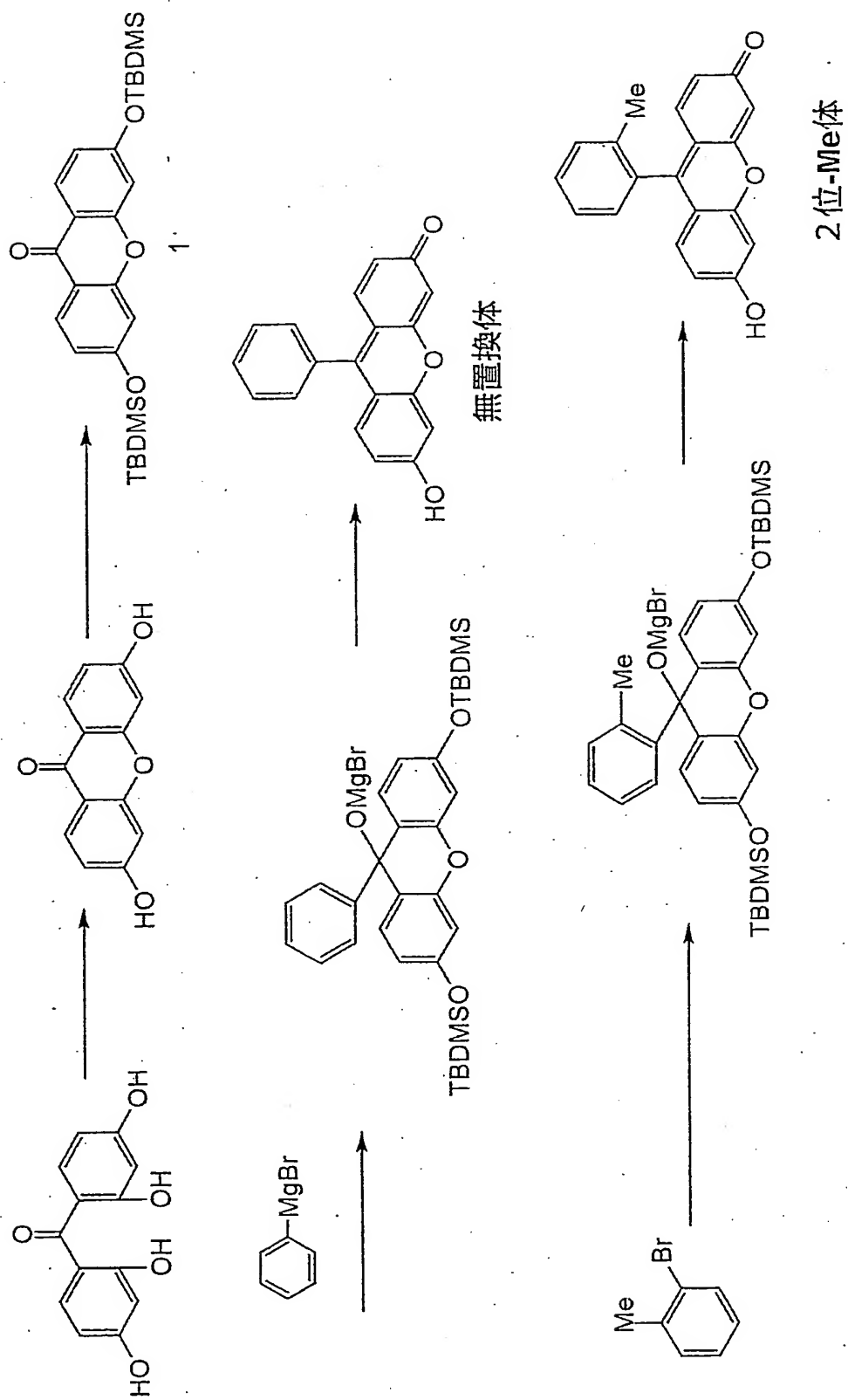
以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例 1 : 化合物の合成

下記の化合物を合成した。これらの化合物は化合物 No. が大きくなるほどキ

サンテン環の9-位に結合するベンゼン環の酸化電位が低くなる（すなわち電子密度が高くなる、換言すればHOMO軌動エネルギーが高くなる）ように設計した。また、無置換ベンゼン体及び化合物1の合成スキームを以下に示した（スキーム中、Meはメチル基を示す）。





キサントンを *Proc. Indian. Acad. Sci. Sect. A.*, 57, 280 (1963) に記載された方法で合成し、得られたキサントンをジ(*tert*-ブチルジメチリシリル) 保護体 (キサントン-TBDMS) とした (*J. Biol. Chem.*, 264, 14, 8171 (1989))。よく乾燥させた容器に Mg 109 mg (4.50 mmol) を入れ、真空ポンプで減圧にしながら 250°C で 180 分間加熱攪拌した。放冷後、アルゴン置換にかえ、2-ブロモトルエン 77 mg (0.45 mmol) を蒸留した THF 2 ml に溶解して加え、60°C まで徐々に加熱した。反応液が暗緑色に変化したのを確認して氷冷した。キサントン-TBDMS 137 mg (0.300 mmol) を蒸留した THF 2 ml に溶解して加え、10 分間攪拌した。反応液に 2N HCl 水溶液 10 ml を加えて攪拌すると黄色固体が析出した。この固体を濾取した後、少量の THF で洗浄して乾燥し黄色固体を得た (87 mg, 収率 96%)。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO) δ 2.00 (3H, s), 7.01 (2H, d, $J=9.15\text{Hz}$), 7.10 (2H, s), 7.21 (2H, d, $J=9.15\text{Hz}$), 7.31 (1H, d, $J=7.14\text{Hz}$), 7.52 (3H, m)

MS(EI) 302 (M^+)

同様にして化合物 2 ~ 化合物 8 を得た。

化合物 2

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO) δ 1.97 (3H, s), 2.42 (3H, s), 7.01 (2H, d, $J=9.15\text{Hz}$), 7.10 (2H, s), 7.21 (4H, m), 7.34 (1H, s)

MS(EI) 316 (M^+)

化合物 3

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO) δ 1.95 (3H, s), 2.35 (3H, s), 6.99 (2H, d, $J=9.15\text{Hz}$), 7.05 (2H, s), 7.12 (1H, s), 7.21 (2H, d, $J=9.15\text{Hz}$), 7.39 (2H, m)

MS(EI) 316 (M^+)

化合物 4

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO) δ 3.70 (3H, s), 7.02 (2H, d, $J=9.20\text{Hz}$), 7.08 (2H,

s), 7.23 (2H, t, J=7.50Hz), 7.34 (4H, m), 7.68 (1H, m)

MS(EI) 318 (M⁺)

化合物 5

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 1.98 (3H, s), 3.86 (3H, s), 6.96 (2H, d, J=9.15Hz), 7.03 (3H, m), 7.10 (1H, s), 7.23 (1H, d, J=8.22Hz), 7.28 (2H, d, J=9.15Hz)

MS(EI) 332 (M⁺)

化合物 6

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 2.33 (3H, s), 3.66 (3H, s), 7.07 (2H, d, J=9.15Hz), 7.14 (3H, m), 7.26 (1H, d, J=8.88Hz), 7.42 (1H, d, J=9.15Hz), 7.48 (1H, d, J=8.88Hz)

MS(EI) 332 (M⁺)

化合物 7

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 3.70 (3H, s), 3.91 (3H, s), 6.83 (1H, d, J=8.43Hz), 6.89 (1H, s), 7.06 (2H, d, J=9.36Hz), 7.12 (2H, s), 7.26 (1H, d, J=8.43Hz), 7.47 (2H, d, J=9.36Hz)

MS(EI) 348 (M⁺)

化合物 8

¹H-NMR (300MHz, DMSO) δ 3.64 (3H, s), 3.76 (3H, s), 6.96 (1H, s), 7.04 (2H, d, J=9.15Hz), 7.10 (2H, s), 7.23 (1H, d, J=9.15Hz), 7.30 (1H, d, J=9.15Hz), 7.23 (2H, d, J=9.15Hz)

MS(EI) 348 (M⁺)

例 2

上記で合成した各化合物の蛍光量子収率とベンゼン環部の酸化電位との関係調べた。結果を表 1 及び第 1 図に示す。図に示した結果から明らかなように、各化合物の蛍光量子収率はベンゼン環部の酸化電位に依存して変化した。pH 13 のアルカリ水溶液中ではキサンテン環の OH 基のプロトンは脱離してアニオンに

なっており、この条件では酸化電位が 1.20 V 以下ではほぼ無蛍光となり、1.65 V 以上では量子収率がほぼ 1 に近い蛍光を有していた。その間は酸化電位が低下するに従って量子収率の減少が見られた。pH 3.4 の酸性条件下では、塩基性条件下に比べ蛍光の変化するベンゼン環の酸化電位が変化した。すなわち、酸化電位が 1.60 V 以下ではほぼ無蛍光であり、1.90 V 以上では量子収率がほぼ 0.3 の蛍光を発した。なお、pH 3.4 ではキサンテン環の OH 基はプロトネートしており、この条件下でのフルオレセインの量子収率はほぼ 0.3 位であることが知られている。

表 1

R=	最大励起 波長 ^{a)} (nm)	最大蛍光 波長 ^{a)} (nm)	酸化 電位 ^{b)} (V vs SCE)	HOMO エネルギー ^{c)} (hartrees)	Φ_{fl} (pH 13)	Φ_{fl} (pH 3.4)
2-Me (1)	491	510	2.19	-0.2356	0.847	0.319
2,4-DiMe (2)	491	510	2.08	-0.2304	0.865	0.307
2,5-DiMe (3)	491	510	1.98	-0.2262	0.887	0.319
2-OMe (4)	494	515	1.75	-0.2174	0.860	0.076
2-Me-4-OMe (5)	492	509	1.66	-0.2141	0.840	0.010
2-OMe-5-Me (6)	494	514	1.57	-0.2098	0.500	0.004
2,4-DiOMe (7)	494	513	1.44	-0.2063	0.200	0.001
2,5-DiOMe (8)	494	512	1.26	-0.1985	0.010	0.000
フルオレセイン	492	511	n.d. ^{d)}	-0.2646	0.850	n.d. ^{d)}

a) 0.1N NaOH 水溶液中で測定した。

b) データは 0.1M 過塩素酸テトラブチルアンモニウム (TBAP) を含むアセトニトリル中で測定した。

- c) データは Gaussian 98W を用いて B3LYP/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d) により得た。
d) 測定せず。

例 3

一般に化合物の酸化電位は量子化学計算により予測可能である。そこで、上記化合物のベンゼン環部位の HOMO エネルギーを密度汎関数法 (B3LYP/6-31G(d)) により求め、これと蛍光量子収率との関係をプロットした。その結果、例 2 で酸化電位を指標として得られた結果とほぼ同様の関係が得られた (第 2 図)。この結果から、これらの化合物の蛍光特性は量子化学計算から定量的に予想可能であることが示された。この知見に基づいて、本発明の合理的な蛍光プローブ設計方法を実施することができる。

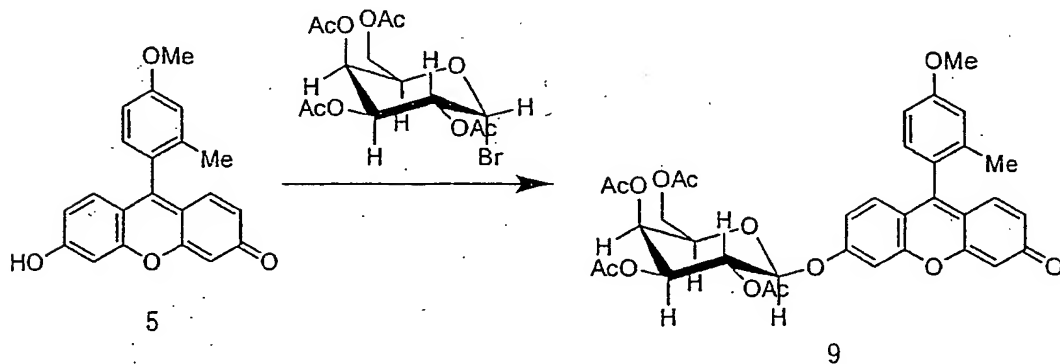
例 4

PET (Photoinduced Electron Transfer: 光誘起電子移動) とは蛍光消光の 1 つの方法であり、励起光照射により生成する 1 重項励起蛍光団が蛍光を発して基底状態に戻る速度よりも速く、近隣の電子供与部位 (PET ドナー) から電子移動が起き、蛍光消光が起こるというものである。本発明の化合物を蛍光団であるキサンテン部位と、蛍光を消光する部位であるベンゼン環部 (PET ドナー) に分割して考えた場合、ベンゼン環の酸化電位が低い (すなわち電子密度が高い、換言すれば HOMO エネルギーが高い) と PET によりキサンテン由来の蛍光が消光する。実際、両部位はフルオレセインの X 線結晶解析からほぼ直交していることが明らかになっており、また化合物 1 ~ 8 では励起・蛍光波長がほぼ同じであることから、本発明の化合物を 2 つの部位に分割して考察する仮説は妥当性が高い。PET の概念図及びフルオレセインを 2 つの部位に分割した概念図を第 3 図に示した。

蛍光プローブは、測定対象物質により R^5 が切断されていない場合には蛍光が無く、測定対象物質により R^5 が切断されて初めて蛍光を発する機能を持つ分子

である。すなわち、前者の状態ではP E Tにより蛍光が消光しており、後者の状態ではP E Tが起こらなくなる蛍光プローブを設計することにより、理想的な蛍光プローブが得られる。ベンゼン環部がどの程度の酸化電位を持てば蛍光プローブとして望ましい性質を有するかは、例えば例2に示した実験で容易に明らかにすることが可能であり、また新規の蛍光団に対してもその還元電位を測定することで容易に予想可能である。本発明の化合物では、P E Tドナー部として作用するベンゼン環部位の酸化電位は変化せず、キサンテン環部位の還元電位がR⁵の切断により変化してP E Tを障害し、その結果としてR⁵が切断された化合物から蛍光が発せられる。この際、P E Tドナー部の酸化電位は量子化学計算から予想可能である。以上のステップにより、目的とする蛍光プローブを一切の合成無しに設計することが可能となる。

例5：β-ガラクトシダーゼ蛍光プローブの製造



よく乾燥した容器に無水ジメチルホルムアミド (0.5 ml)、化合物5 10 mg (30 μ mol)、Cs₂CO₃ 100 mg (300 μ mol)、2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-β-D-ガラクトピラノシルブロミド 100 mg (250 μ mol)を加えた。アルゴン置換し、攪拌しつつ室温にて終夜反応させた。沈殿物を濾去し、母液を減圧濃縮した。得られた残渣を精製水に溶解しジクロロメタンで3回抽出し、有機相を飽和食塩水で洗浄して無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去して黄色粉末を得た。溶出溶媒とし

でジクロロメタン-メタノール (100:3) を用い、シリカゲルカラムクロマトグラフイーにて精製し化合物 9 のオレンジ色粉末を得た (11.3 mg, 57%)。

^1H NMR (300 MHz / CDCl_3) δ 7.15-6.38 (m, 9H), 5.52 (m, 2H), 5.18-5.12 (m, 2H), 4.25-4.12 (m, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.03 (s, 3H)

EI-MS: M^+ = 678

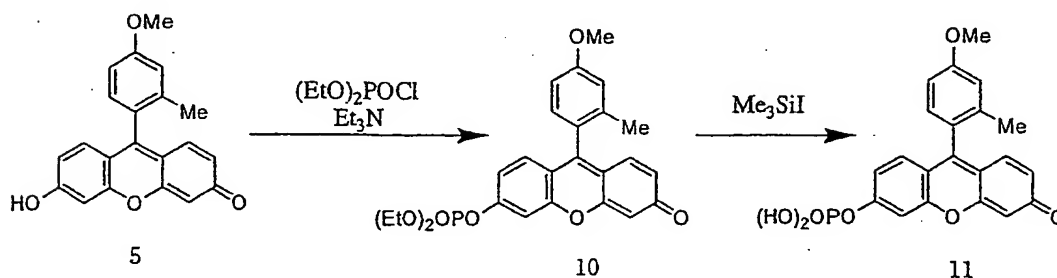
例 6 : β -ガラクトシダーゼ蛍光プローブを用いた β -ガラクトシダーゼの測定

例 5 で得た化合物 9 (テトラアセテート体) を無水ジメチルスルホキシドに溶解し 100 mM ストック溶液を調製した。この溶液を 2M ナトリウムメトキシドで 0°C、一時間処理して糖部分の 4 つのアセチル基を加水分解した化合物 (以下、この化合物を「本発明蛍光プローブ A」と呼ぶ。) を得た。その後目的の濃度になるようバッファーで希釈して反応を停止した。インビトロでの β -ガラクトシダーゼとの反応では、本発明蛍光プローブ A の最終濃度が 1 μM となるように調整し、バッファーとして 100 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.4) を用い、最終的に 14.3 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM MgCl_2 、0.001% ジメチルスルホキシド、0.01% メタノール、6 U β -ガラクトシダーゼを含む溶液 3 ml を調製して 1 cm キュベットの中で 37°C にて反応を行った。蛍光強度変化は、Perkin-Elmer LS-50B 蛍光スペクトル測定装置を用いて観測した。 β -ガラクトシダーゼ (分子量 540,000, EC 3.2.1.23) はシグマ-アルドリッチより購入した。生細胞でのアッセイでは本発明蛍光プローブ A の最終濃度が 10 μM となるように調整し、バッファーとして生理食塩水 (pH 7.4; 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, 0.1 % グルコース; 以下 PSS と略す) を用いて調製した溶液を用いた。GP293 細胞に LNCX2-lacZ を導入したもの (lacZ 陽性細胞) をコラーゲンタイプ 1 でコートした 24 ウェルマイクロプレートに播種し、ウェルを PSS で 2 回洗浄した後、上記の本発明蛍光プローブ A の溶液を加えて 30 分間室温でインキュベーションした。ベクターを導入していない GP293 細胞 (lacZ 陰性細胞) を陰性対照

として用いた。蛍光イメージング像は、カメラとして DC 300F カメラ（ライカ）、対物レンズとして UPlanFl 10x/0.31 対物レンズ（オリンパス光学）を取り付けた IX70 倒立顕微鏡（オリンパス光学）を用い、励起波長 488 nm、蛍光波長 510–550 nm の条件で撮像した。

本発明蛍光プローブ A は β -ガラクトシダーゼにより糖部分が容易に切断され、実質的に無蛍光の状態（蛍光量子収率=0.009）から強い蛍光性化合物（蛍光量子収率=0.84）に変化した。第 4 図に β -ガラクトシダーゼ添加後の蛍光の経時変化を示す。比較化合物として公知のフルオレセイン- β -D-ガラクトシド（FDG）を用いた。本発明蛍光プローブ A は FDG に比べて反応速度が速く、短時間で高い蛍光強度を与えた。この結果から、本発明蛍光プローブ A により、 β -ガラクトシダーゼ活性を高感度に測定できることがわかる。生細胞を用いた試験結果を第 5 図に示す。lacZ 陽性細胞の場合のみに蛍光が認められ、本発明蛍光プローブ A を用いて細胞中の β -ガラクトシダーゼを高感度に測定できることがわかる。また、本発明蛍光プローブ A は、生理的条件下で細胞膜を透過して容易に細胞内に到達していることも示された。

例 7：アルカリフォスファターゼ蛍光プローブの製造



よく乾燥した容器に無水クロロホルム 4 ml、化合物 5 15.7 mg (47 μ mol), トリエチルアミン 16.4 μ l (118 μ mol), クロロりん酸ジエチル 6.8 μ l (47 μ mol)を加えた。アルゴン置換し、攪拌しつつ室温にて一晩反応させた。反応溶媒

を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムにて精製（溶出溶媒；ジクロロメタン-メタノール（100:3））し、化合物 10（26.2 mg、定量的、オレンジ色粉末）を得た。

^1H NMR (300 MHz / CDCl_3) δ 1.39(m, 6H), 2.05(s, 3H), 3.89(s, 3H), 4.27(m, 4H), 6.45(d, $J=2.0\text{Hz}$), 6.58(dd, $J=9.7\text{Hz}$, 2.0Hz), 6.86-7.35(m, 7H)

HR-MS[ESI-MS]: $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for 369.14161, found 369.13810

よく乾燥した容器に無水ジクロロメタン 1 ml、化合物 10 26.0 mg (56 μmol)、ヨードトリメチルシラン 19.7 μl (140 μmol)を加えた。アルゴン置換し、撹拌しつつ室温にて一時間反応させた。反応溶媒を留去し、得られた残渣を逆相プレパラティブ TLC RP18W にて精製（展開溶媒；アセトニトリル/ 水（1:1））し、化合物 11（TG-Phos）（1.6 mg、収率 5.6%、オレンジ色粉末）を得た。

^1H NMR (300 MHz / CD_3OD) δ 2.02(s, 3H, a), 3.90(s, 3H, c), 6.48(d, $J=2.0\text{Hz}$, i), 6.60(dd, $J=9.6\text{Hz}$, 2.0Hz , j), 6.96-7.71(m, 7H, b, d, e, f, g, h, k)

HR-MS[ESI-MS]: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for 411.06336, found 411.05935

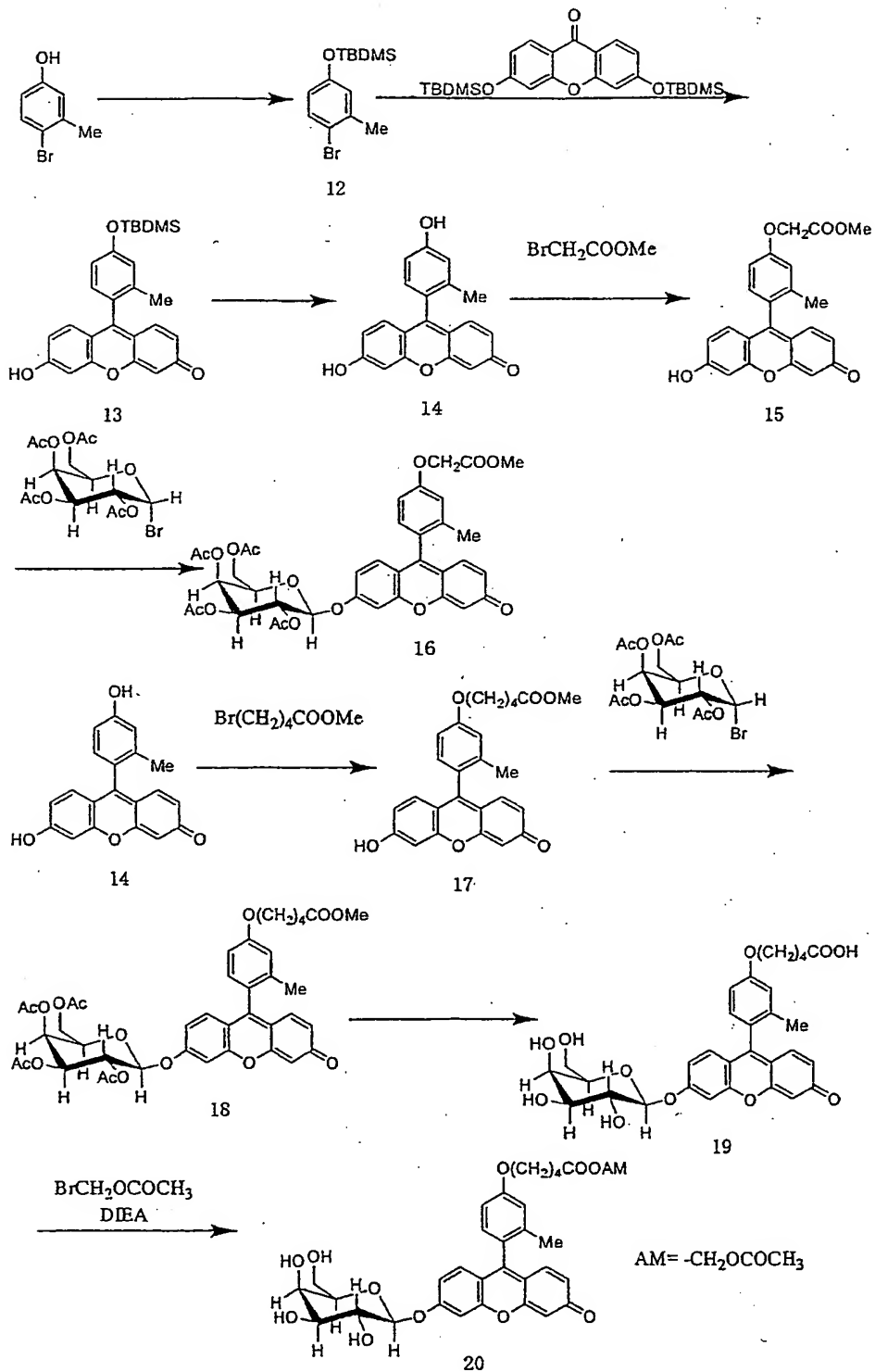
Φ_{fl} (100 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH7.4) = 0.029

例 8：イン・ビトロ アルカリフォスファターゼ蛍光アッセイ

化合物 11 を脱水メタノールに溶解し 1 mM のストック溶液を作製した。その後 1 μM になるようにアッセイバッファーに希釈した（アッセイバッファー：0.1 M トリス-塩酸バッファー, pH 7.4, 0.5 mM 塩化マグネシウム, 0.1%メタノール）。この希釈液 3 ml を 1 cm キュベットに移し、37 $^{\circ}\text{C}$ にてアルカリフォスファターゼ (0.08 units/ 蛍光測定開始後 5 分に添加) による蛍光強度変化を測定した（第 6 図）。測定には、Perkin-Elmer LS-50B 蛍光スペクトル測定装置を用い励起波長 491 nm、510 nm での蛍光強度変化の経時変化を観察した。アルカリフォスファターゼ（分子量 160 kDa, EC 3.1.3.1）は、シグマ-アルドリッチより購入した。第 7 図には、TG-Phos のアルカリフォスファターゼによる反応前後の蛍光スペク

トル変化(a)及び吸収スペクトル(b)変化を示した。

例 9：細胞内滞留型 β -ガラクトシダーゼ蛍光プローブの製造



よく乾燥した容器に無水ジメチルホルムアミド 10 ml、4-ブロモ-3-メチルフェノール 2 g (10.7 mmol)、tert-ブチルジメチルシリルクロライド (TBDMS-Cl) 4.8 g (30 mmol)、イミダゾール 3.6 g (50 mmol)を加えた。アルゴン置換し、室温にて三時間攪拌後、溶媒を真空ポンプにて留去した。得られた残渣を精製水に溶解しジクロロメタンで三回振りとり、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ジクロロメタンを留去して、化合物 1 2 (3.04 g、収率 94.7%、無色透明液体)を得た。

^1H NMR (300 MHz / CDCl_3) δ 7.33(d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 6.72(d, $J=2.9\text{Hz}$, 1H), 6.53(dd, $J=8.6\text{Hz}$, 2.9Hz, 1H), 2.32(s, 3H), 0.97(s, 9H), 0.18(s, 6H)

EI-MS: M^+ = FAB-MS; $[M]^+=300$, 302

化合物 1 2 1.28 g (4.27 mmol)を蒸留したテトラヒドロフラン 10 ml に溶解し、よく乾燥させアルゴン置換した二頸コルベンにシリンジで加えた。反応液をドライアイス-アセトンで -78°C に保ち、tert-ブチルリチウム n-ペンタン溶液 4.5 ml (6.57 mmol)をシリンジで少量ずつ加えた。30 分間攪拌後、蒸留したテトラヒドロフラン 20 ml に溶解した 3, 6-ビス (tert-ブチルジメチルシリルオキシ) キサントン 1.07 g (2.37 mmol)をシリンジで少量ずつ加えた。 -78°C のまま 30 分間攪拌後、2N 塩酸で中和し、析出した赤色物質をろ取した。ろ取した物質をシリカゲルカラムにて精製 (溶出溶媒; ジクロロメタン-メタノール (100:3-100:5)) し、化合物 1 3 (774.6 mg、収率 82%、オレンジ色粉末)を得た。

^1H NMR (300 MHz / CD_3OD) δ 7.27(d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.15(d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 7.01-6.86(m, 6H), 2.01(s, 3H), 1.06(s, 9H), 0.31(s, 6H)

FAB-MS; $[M+1]^+=433$

蒸留したテトラヒドロフラン 200 ml に化合物 1 3 2.62 g (6.2 mmol) を溶解し、フッ化テトラブチルアンモニウム (TBAF) の 1M テトラヒドロフラン溶液 6.2

ml (6.2 mmol) を加えた。アルゴン置換し、室温にて二時間攪拌後、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムにて精製（溶出溶媒；ジクロロメタン-メタノール (100:5 - 100:7)）し、化合物 14 (1.13g、収率 57.7%、オレンジ色粉末) を得た。

^1H NMR (300 MHz / CD_3OD) δ 7.06 (d, $J=9.7\text{Hz}$, 2H), 6.94 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 6.78 (d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 6.74 (dd, $J=8.2\text{Hz}$, 2.4Hz, 1H), 6.63 (dd, $J=9.7\text{Hz}$, 2.0Hz, 2H), 6.63 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 2H), 1.88 (s, 3H)

HR-MS (ESI-MS): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for 319.09703, found 319.09652.

よく乾燥した容器に無水ジメチルホルムアミド 1 ml、化合物 14 60 mg (0.18 mmol)、ブromo酢酸メチル 17 μl (0.18 mmol)、炭酸セシウム 400 mg (1.2 mmol) を加えた。アルゴン置換し、攪拌しつつ室温にて一晩反応させた。沈殿物を桐山ロートにて除去し、母液を真空ポンプにて留去した。得られた残渣を精製水に溶解しジクロロメタンで三回振りとり、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ジクロロメタンを留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムにて精製（溶出溶媒；ジクロロメタン-メタノール (100:5)）し、化合物 15 (41.7 mg、収率 56.9%、赤色粉末) を得た。

^1H NMR (300 MHz / CDCl_3) δ 7.10 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.08 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 6.95 (d, $J=2.5\text{Hz}$, 1H), 6.89 (dd, $J=8.4\text{Hz}$, 2.5Hz, 1H), 6.84 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 2H), 6.80 (dd, $J=9.2\text{Hz}$, 2.0Hz, 2H), 4.73 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.03 (s, 3H)

FAB-MS: $\text{M}+1=391$

Φ_{fl} (100 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH9.0) = 0.87

よく乾燥した容器に無水ジメチルホルムアミド 0.5ml、化合物 15 39 mg (0.1mmol)、炭酸セシウム 200mg (0.6 mmol)、2, 3, 4, 6-テトラ- O -アセチル- α -D-ガラクトピラノシルブロミド 100 mg (0.25 mmol) を加えた。アルゴン置換し、攪拌しつつ室温にて一晩反応させた。沈殿物を桐山ロートにて

除去し、母液を真空ポンプにて留去した。得られた残渣を精製水に溶解しジクロロメタンで三回振りとり、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ジクロロメタンを留去した。残渣をシリカゲルカラムにて精製（溶出溶媒；ジクロロメタン-メタノール（100:3））し、化合物 16 (2-Me 4-OCH₂COOMe TG-βGal) (41.8 mg、収率 58.1%、オレンジ色粉末)を得た。

¹H NMR (300 MHz / CDCl₃) δ 7.10-6.80(m, 7H), 6.57(dd, J=9.7Hz, 1.9Hz, 1H), 6.40(d, J=1.9Hz, 1H), 5.57-5.48(m, 2H), 5.18-5.12(m, 2H), 4.73(s, 2H), 4.22-4.16(m, 3H), 3.87(s, 3H), 2.19, 2.13, 2.07, 2.03(s, 3H×4), 2.05(s, 3H)
HR-MS (ESI-MS): [M+Na]⁺ calcd for 743.19519, found 743.19309.

Φ_{fl} (100 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH7.4) = 0.069

よく乾燥した容器に無水ジメチルホルムアミド (1 ml)、化合物 14 63.8 mg (0.20 mmol)、5-ブロモ吉草酸メチル 21 μl (0.18 mmol)、炭酸セシウム 400 mg (1.2 mmol)を加えた。アルゴン置換し、攪拌しつつ室温にて一晩反応させた。沈殿物を桐山ロートにて除去し、母液を真空ポンプにて留去した。得られた残渣を精製水に溶解しジクロロメタンで三回振りとり、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ジクロロメタンを留去した。残渣をシリカゲルカラムにて精製（溶出溶媒；ジクロロメタン-メタノール(100:5)）し、化合物 17 (53.7 mg、収率 61.9%、赤色粉末)を得た。

¹H NMR (300 MHz / CDCl₃) δ 7.10(d, J=9.2Hz, 2H), 7.07(d, J=8.3Hz, 1H), 6.91-6.84(m, 4H), 6.81(dd, J=9.2Hz, 2.0Hz, 2H), 4.06(m, 2H), 3.70(s, 3H), 2.45(m, 2H), 2.02(s, 3H), 1.88(m, 4H)

HR-MS (ESI-MS): [M+Na]⁺ calcd for 455.14706, found 455.14692.

Φ_{fl} (100 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH9.0) = 0.82

よく乾燥した容器に無水ジメチルホルムアミド 0.5 ml、化合物 17 18.2 mg (42 μmol)、炭酸セシウム 250 mg (0.77 mmol)、2, 3, 4, 6-テトラ-*O*-

アセチルー α -D-ガラクトピラノシルブロミド 100 mg (0.25 mmol)を加えた。アルゴン置換し、撹拌しつつ室温にて一晩反応させた。沈殿物を桐山ロートにて除去し、母液を真空ポンプにて留去した。得られた残渣を精製水に溶解しジクロロメタンで三回振りとり、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ジクロロメタンを留去した。残渣をシリカゲルカラムにて精製（溶出溶媒；酢酸エチル）し、化合物 18 (25 mg、収率 78%、オレンジ色粉末)を得た。

^1H NMR (300 MHz / CDCl_3) δ 7.08-6.80(m, 7H), 6.57(dd, $J=9.7\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H), 6.39(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 5.56-5.48(m, 2H), 5.18-5.12(m, 2H), 4.22-4.11(m, 3H), 4.06(m, 2H), 3.70(s, 3H), 2.19, 2.13, 2.07, 2.03(s, $3\text{H}\times 4$), 1.88(m, 4H)

HR-MS (ESI-MS): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for 785.24214, found 785.23729.

Φ_{fl} (100 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH7.4) = 0.005

化合物 18 37.7 mg (0.049 mmol)を 2 ml のメタノール/水 (3:1)溶液に溶解し、2 M 水酸化ナトリウム水溶液 1 ml (2 mmol)を加えた。0 °C にて 30 分間撹拌後、アンバーライト IR-120 (H^+) にて反応液を中和し溶媒を留去した。得られた残渣を、展開溶媒をアセトニトリル/水(1:1)として逆相のプレパラティブ TLC (RP18W) にて精製し、化合物 19 (2-Me 4-O(CH_2) $_4$ COOH TG- β Gal) (15.1 mg、収率 53%、オレンジ色粉末)を得た。

^1H NMR (300 MHz / CD_3OD) δ 7.26(d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 7.11(d, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 7.08(d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 7.03(d, $J=8.2\text{Hz}$, 1H), 7.02(dd, $J=8.5\text{Hz}$, 2.2Hz, 1H), 6.94(d, $J=2.3\text{Hz}$, 1H), 6.89(dd, $J=8.2\text{Hz}$, 2.3Hz, 1H), 6.53(dd, $J=9.6\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H), 6.37(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 4.01(m, 2H), 5.00(dd, $J=7.7\text{Hz}$, 2.6Hz, 1H), 3.83(d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 3.82-3.64(m, 4H), 3.53(dd, $J=9.7\text{Hz}$, 3.3Hz, 1H), 2.17(m, 2H), 1.93(s, 3H), 1.74(m, 4H)

HR-MS (ESI-MS): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for 603.18423, found 603.18242.

化合物 19 (2-Me 4-O(CH_2) $_4$ COOH TG- β Gal) 10 mg (17.2 μmol) をメタノ

ール/アセトニトリル (1ml/2 ml) に溶解し、そこへアセトニトリル 2 ml に溶解した酢酸ブロモメチル (AMBr) 68.5 μ l (690 μ mol)、ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) 22.3 μ l (130 μ mol) を加えた。アルゴン置換し、室温にて 10 時間攪拌後、溶媒を留去した。残渣を、展開溶媒をアセトニトリル/水(1:1) として逆相プレパラティブ TLC (RP18W) にて精製し、化合物 20 (2-Me 4-O(CH₂)₄COOAM TG- β Gal) (10.9 mg、収率 97%、オレンジ色粉末) を得た。

¹H NMR (300 MHz / CD₃OD) δ 7.28(d, J=2.2Hz, 1H), 7.13-6.88(m, 6H), 6.53(dd, J=9.7Hz, 2.0Hz, 1H), 6.38(dd, J=2.0Hz, 1H), 5.65(s, 2H), 4.02(m, 2H), 5.01(dd, 8.1Hz, 2.8Hz, 1H), 3.83(d, J=3.1Hz, 1H), 3.79-3.65(m, 4H), 3.53(dd, 9.5Hz, 3.6Hz, 1H), 2.42(m, 2H), 1.99(s, 3H), 1.94(s, 3H), 1.78(m, 4H)

HR-MS (ESI-MS): [M+Na]⁺ calcd for 675.20536, found 675.20359

Φ_{fl} (100 mM リン酸ナトリウムバッファー, pH9.0) = 0.008

例 10: イン・ビトロ β -ガラクトシダーゼ蛍光アッセイ

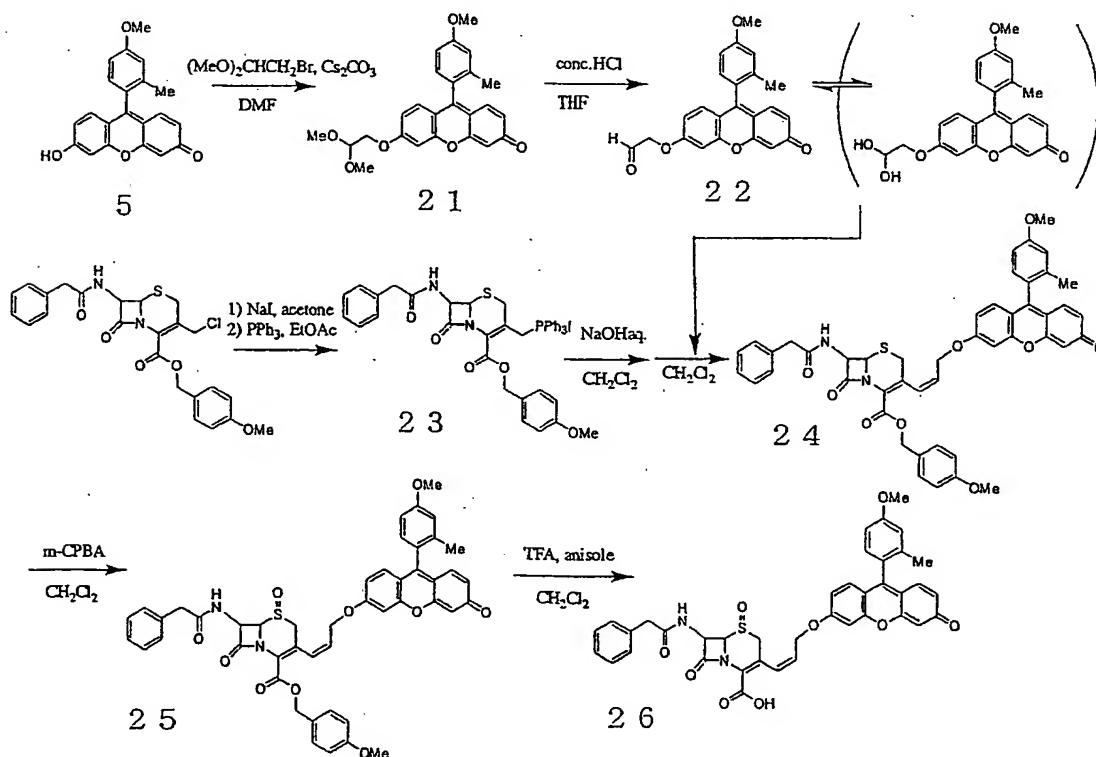
2-Me 4-O(CH₂)₄COOAM TG- β Gal を無水ジメチルスルホキシドに溶解し 10 mM ストック溶液を作製した。その後 1 μ M になるようアッセイバッファーに希釈した (アッセイバッファー: 0.1 M リン酸ナトリウムバッファー, pH 7.4, 14.3 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM 塩化マグネシウム、0.01% ジメチルスルホキシド)。3 ml を 1 cm キュベットに移し、37 °C にて β -ガラクトシダーゼ (6 units/蛍光測定開始後 5 分に添加) による蛍光強度変化を測定した (第 8 図及び第 9 図)。測定には、Perkin-Elmer LS-50B 蛍光スペクトル測定装置を用い励起波長 492 nm、509 nm での蛍光強度変化の経時変化を観察した。 β -ガラクトシダーゼ (分子量 540,000, EC 3.2.1.23) はシグマ-アルドリッチより購入した。

例 11: 生細胞系での β -ガラクトシダーゼ蛍光アッセイ

生細胞でのアッセイは 2-Me 4-O(CH₂)₄COOAM TG- β Gal の最終濃度が約 10 μ M になるように生理食塩水 pH 7.4 (150 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂,

5 mM HEPES, 0.1% グルコース; 以下 PSS と略す) に調整した。GP293 細胞に LNCX2-lacZ を導入したもの (lacZ 陽性細胞) をコラーゲンタイプ 1 でコートした 24 ウェルマイクロプレートに播種し、ウェルを PSS で 2 回洗浄した後上記 2-Me-4- $(\text{CH}_2)_4\text{COOAM}$ TG- β Gal 溶液をロードし、30 分間室温でインキュベーションした。ベクターを導入していない GP293 細胞 (lacZ 陰性細胞) を陰性対照として用いた。蛍光イメージング像は、対物レンズとして UApo/340 40x/1.35 対物レンズ (オリンパス光学) を取り付けた IX71 倒立顕微鏡 (オリンパス光学) を用い、励起波長 488 nm、蛍光波長 510–550 nm の条件で撮像した。結果を第 10 図に示す。図中、GP293 細胞内部に蛍光が観察され、GP293 細胞内部において β -ガラクトシダーゼが発現している結果を示す。

例 12: β -ラクタマーゼ蛍光プローブの製造



よく乾燥した容器に無水ジメチルホルムアミド 8 ml、化合物 5 122.4 mg (0.4

mmol)、2-ブロモ-1, 1-ジメトキシエタン 400 μ l (4 mmol)、炭酸セシウム 180 mg (0.6 mmol)を加えた。アルゴン置換し、115 $^{\circ}$ Cにて一晩攪拌した。炭酸セシウムを桐山漏斗で濾過後、溶媒を真空ポンプにて留去した。得られた残渣を精製水に溶解しジクロロメタンで三回振りとり、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ジクロロメタンを留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムにて精製(溶出溶媒; ジクロロメタン-メタノール (100:4))し、化合物 21 (78.3 mg、収率 50.6%、オレンジ色粉末)を得た。

^1H NMR (300 MHz / CDCl_3) δ 2.04(s, 3H), 3.48(s, 6H), 3.89(s, 3H), 4.11(d, $J=5.1\text{Hz}$, 2H), 4.76(t, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 6.43(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.57(dd, $J=9.7\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H), 6.43-7.14(m, 7H)

^{13}C -NMR (75MHz/ CDCl_3) δ 19.91, 54.34, 55.29, 68.13, 101.07, 101.71, 105.66, 111.50, 113.54, 115.02, 115.96, 118.79, 124.48, 129.53, 129.98, 130.31, 130.66, 137.79, 149.44, 154.41, 158.89, 160.32, 162.93, 185.74

HR-MS [ESI-MS]: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for 443.14706, found 443.14794

よく乾燥した容器に蒸留したテトラヒドロフラン 8ml、化合物 21 50 mg (120 μ mol)を加えた。氷浴にて 0 $^{\circ}$ Cに保ち濃塩酸 4mlをゆっくり加え、アルゴン雰囲気下、一晩攪拌した。溶媒を留去し、ジクロロメタンで三回振りとり、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ジクロロメタンを留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムにて精製(溶出溶媒; ジクロロメタン-メタノール (100:4))し、化合物 22 (40.7 mg、収率 90%、オレンジ色液体)を得た。

^1H -NMR (300MHz/ CD_3OD) δ 2.01(s, 3H), 3.88(s, 3H), 4.07(dd, $J=10.3\text{Hz}$, 4.95Hz, 1H), 4.13(dd, $J=10.3\text{Hz}$, 4.95Hz, 1H), 4.90(t, $J=4.95\text{Hz}$, 1H), 6.45(d, $J=2.0\text{Hz}$,

HR-MS [ESI-MS]: $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for 375.12325, found 375.11547

よく乾燥した容器に蒸留したアセトン 20 ml、7-フェニルアセタミド-3-クロロメチルーセファロスポラン酸 p-メトキシベンジルエステル 490 mg (1

mmol)、ヨウ化ナトリウム 750 mg (5 mmol)を加えた。アルゴン置換し、室温で一時間半攪拌した。溶媒を留去し、酢酸エチル 25 ml で振りとり、10 % チオ硫酸ナトリウム水溶液、蒸留水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。そこへトリフェニルホスフィン 320 mg (1.2 mmol)を加え、アルゴン置換し、室温で一晩攪拌した。析出物を桐山ロートでろ取し、酢酸エチルで洗い、化合物 2 3 (664.3 mg、収率 78.6%、淡黄色粉末)を得た。

MR-MS [ESI-MS]: $[M-I]^+ = 713$

よく乾燥した容器に蒸留したジクロロメタン 4 ml、化合物 2 3 168 mg (0.2 mmol)、1 N 水酸化ナトリウム水溶液 2 ml を加えた。室温で一時間攪拌し、分液ロートにてジクロロメタン 層を分けとり、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。それを、化合物 2 2 24 mg (64.2 μ mol)が入ったフラスコに加え、室温にて一晩攪拌した。溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムにて精製 (溶出溶媒; ジクロロメタン-メタノール (100:4)) し、化合物 2 4 (10.3 mg、収率 21%、オレンジ色粉末)を得た。

HR-MS (ESI-MS): $[M+Na]^+$ calcd for 831.23522, found 831.23070.

よく乾燥した容器に蒸留したジクロロメタン 2 ml、化合物 2 4 122.6 mg (0.15 mmol)、m-クロロ過安息香酸 26 mg (0.15 mmol)を加えた。アルゴン置換し、0 °C で一晩攪拌した。ジクロロメタンを加え、1 N 炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムにて精製 (溶出溶媒; ジクロロメタン-メタノール (100:6)) し、化合物 2 5 (105 mg、収率 84%、オレンジ色粉末)を得た。

HR-MS (ESI-MS): $[M+Na]^+$ calcd for 847.23013, found 847.23210.

よく乾燥した容器に蒸留したジクロロメタン 3ml、化合物 2 5 40 mg (0.26 mmol)、アニソール 150 μ l (1.38 mmol)、トリフルオロ酢酸 750 μ l (9.7 mmol)

を加えた。アルゴン置換し、0 °Cで4時間攪拌した。溶媒を留去し、得られた残渣を精製水に溶解し酢酸エチルで三回振りとり、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、酢酸エチルを留去した。得られた残渣を逆相プレパラティブ TLC(RP18W)にて精製(溶出溶媒;アセトニトリル/水(1:1))し、化合物26(TG- β Lac)(9.4 mg、収率27.6%、オレンジ色粉末)を得た。

HR-MS(ESI-MS): [M-H]⁻ calcd for 703.17503, found 703.17719

例13: インビトロ β -ラクタマーゼ蛍光アッセイ

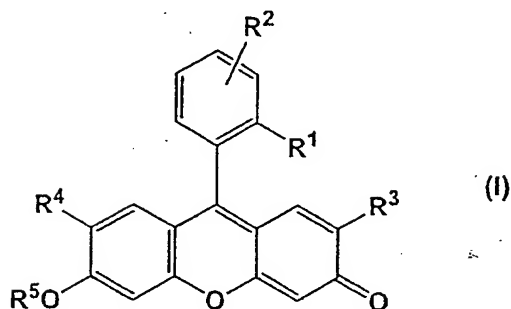
TG- β Lac (1 μ M)を含むアッセイバッファー(リン酸緩衝食塩水(PBS), Ca²⁺, Mg²⁺非含有, pH 7.4, 0.1% ジメチルスルホキシド)に、測定開始5分後、0.3 unit の β -ラクタマーゼを添加し、491 nm 励起、510 nm での蛍光強度変化を経時観察した。結果を第11図に示す。

産業上の利用可能性

本発明により、蛍光特性に優れた蛍光プローブが提供される。また、本発明の設計方法により、蛍光特性に優れた蛍光プローブを合理的に設計できる。

請求の範囲

1. 蛍光プローブであって、下記の式 (I) :



(式中、 R^1 は水素原子、カルボキシル基、又はスルホン酸基以外の一価の置換基を示し； R^2 は水素原子又は一価の置換基を示し； R^3 及び R^4 はそれぞれ独立に水素原子又はハロゲン原子を示し； R^5 は測定対象物質との接触により切断される一価の基を示し、

ただし、 R^1 及び R^2 の組み合わせは、それらが結合するベンゼン環の酸化電位が、(1)上記切断の前には、式 (I) で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、かつ

(2)上記切断の後には、式 (I) で表される化合物に由来する切断後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように選ばれる。)

で表される蛍光プローブ。

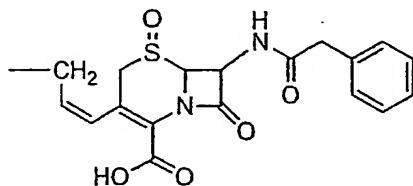
2. 該ベンゼン環の酸化電位が1.55V～1.75Vの範囲となるように R^1 及び R^2 の組み合わせが選ばれる請求の範囲第1項に記載の蛍光プローブ。

3. 該ベンゼン環の酸化電位が1.60V～1.70Vの範囲となるように R^1 及び R^2 の組み合わせが選ばれる請求の範囲第1項に記載の蛍光プローブ。

4. R^3 及び R^4 が水素原子である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の蛍光プローブ。

5. R^1 が低級アルキル基であり、 R^2 が低級アルコキシ基である請求の範囲第4項に記載の蛍光プローブ。

6. R^1 が低級アルキル基であり、 R^2 がキサンテン環残基に対してパラ位の低級アルコキシ基である請求の範囲第5項に記載の蛍光プローブ。
7. 上記の切断が加水分解により生じる請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載の蛍光プローブ。
8. 測定対象物質が加水分解酵素である請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載の蛍光プローブ。
9. R^5 がリン酸エステル加水分解酵素により切断されるホスホノ基である請求の範囲第8項に記載の蛍光プローブ。
10. R^5 が糖加水分解酵素により切断される糖誘導体の残基である請求の範囲第8項に記載の蛍光プローブ。
11. R^5 が β -ガラクトピラノシル基である請求の範囲第10項に記載の蛍光プローブ。
12. R^5 が β -ガラクトピラノシル基であり、 R^2 がカルボキシ置換アルコキシ基又は4-カルボキシブトキシ基である請求の範囲第10項に記載の蛍光プローブ。
13. R^5 が β -ラクタマーゼにより切断される環状アミドを含む基である請求の範囲第8項に記載の蛍光プローブ。
14. 環状アミドを含む基が下記の式で表される基である請求の範囲第13項に記載の蛍光プローブ。



15. 蛍光プローブの設計方法であって、請求の範囲第1項に記載の一般式(I) (式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及び R^5 はそれぞれ上記の定義と同義である) で表される蛍光プローブにおいて、 R^1 及び R^2 の組み合わせとして、それらが結合

するベンゼン環の酸化電位が、

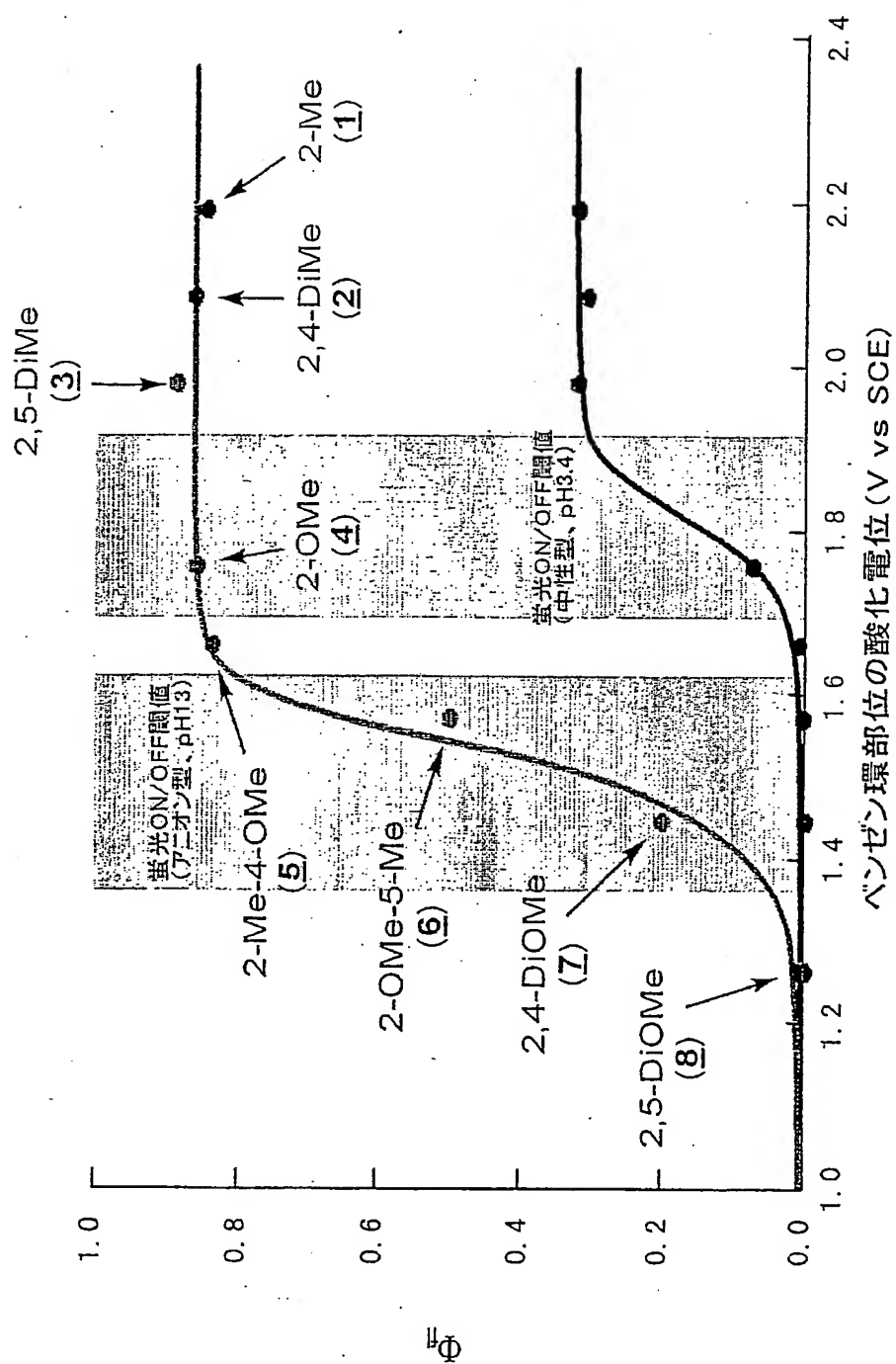
(1) 上記切断の前には、式 (I) で表される化合物が実質的に無蛍光性になるように、かつ

(2) 上記切断の後には、式 (I) で表される化合物に由来する切断後の化合物が実質的に高い蛍光性になるように

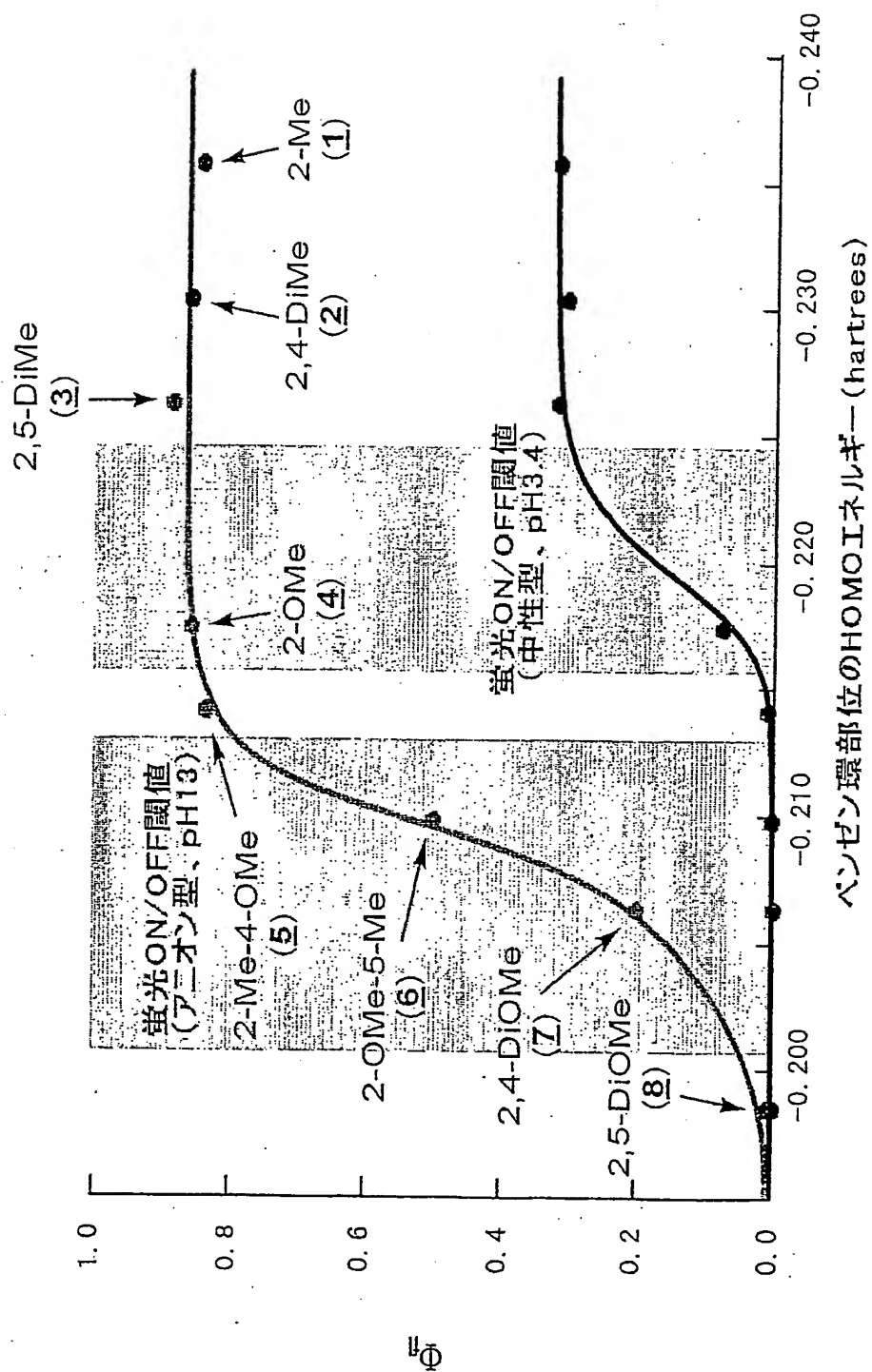
組み合わせを選択する工程を含む方法。

16. 請求の範囲第15項に記載の設計方法により得られた蛍光プローブ。

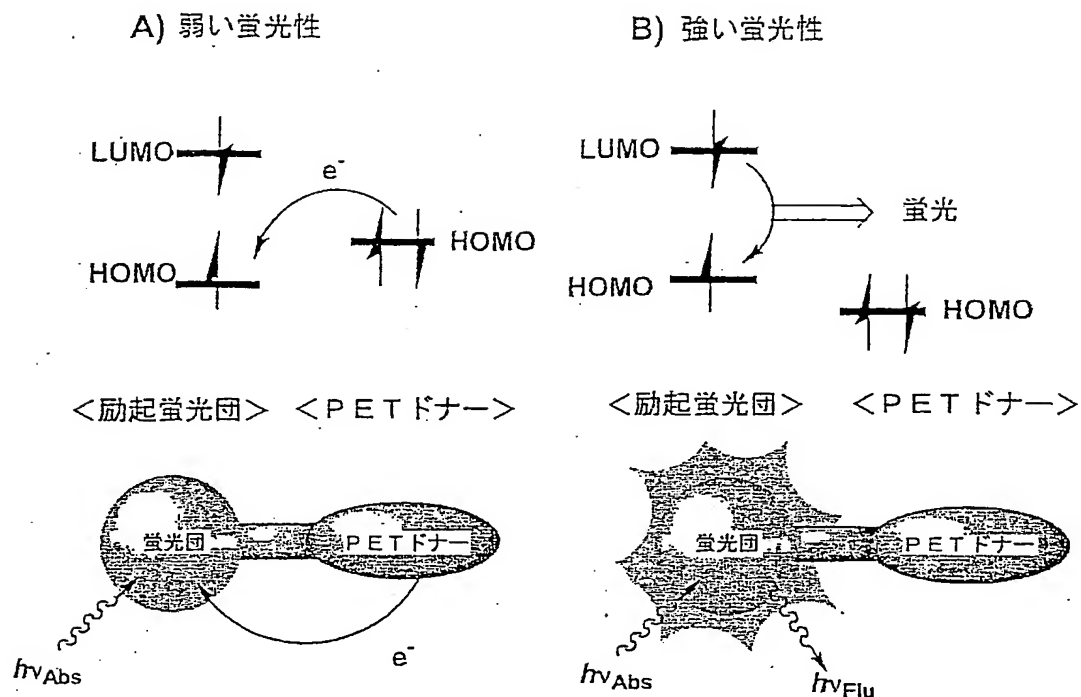
第1図



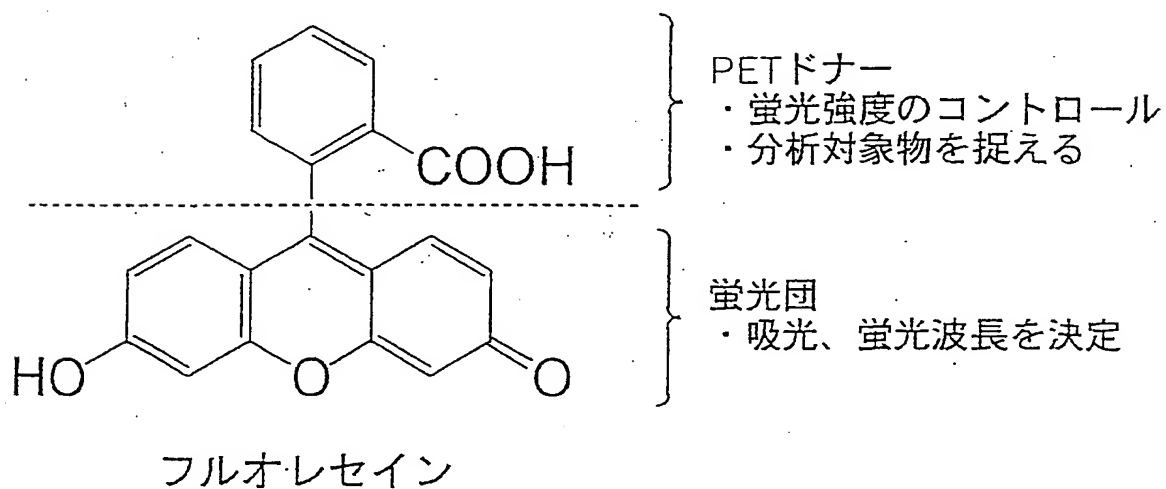
第2図



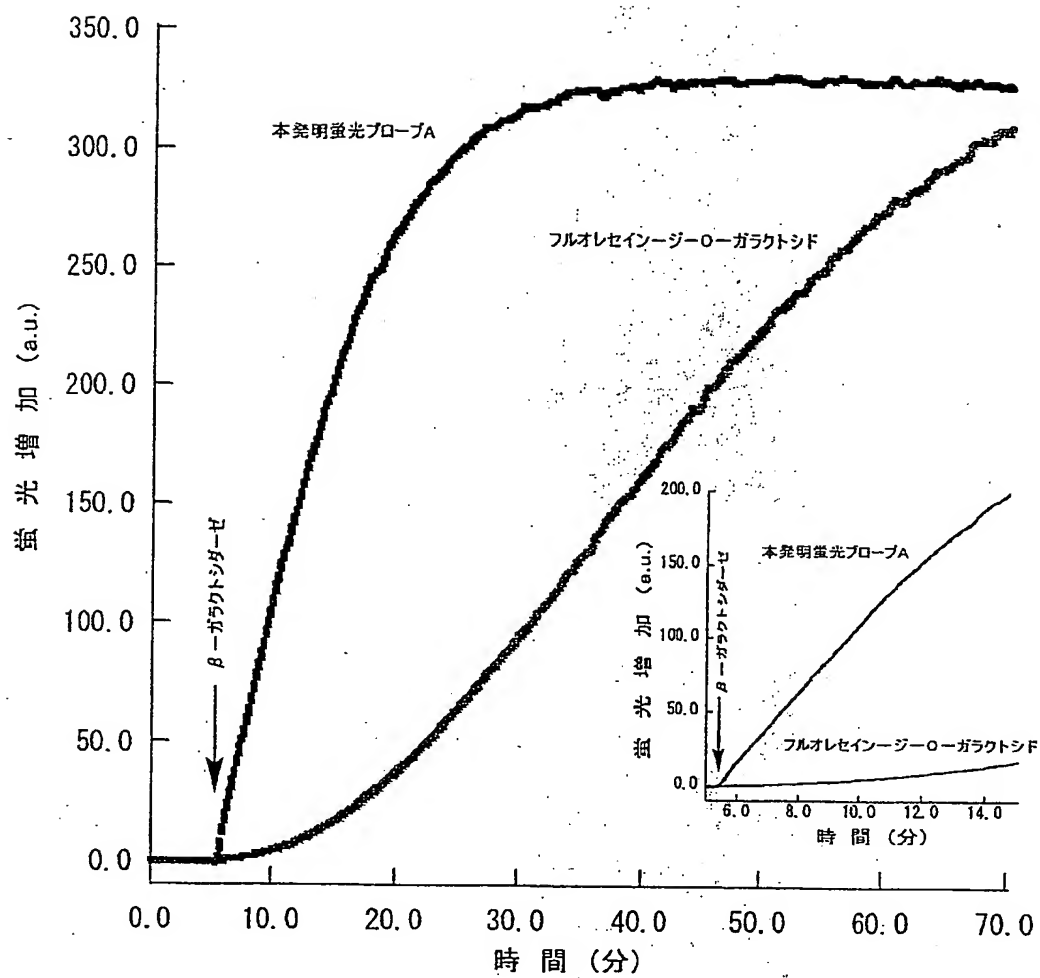
第3図



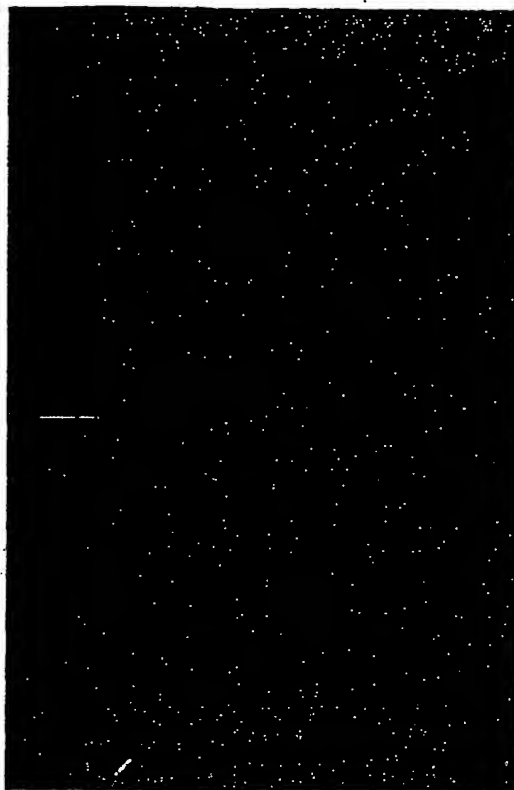
PETの概念図



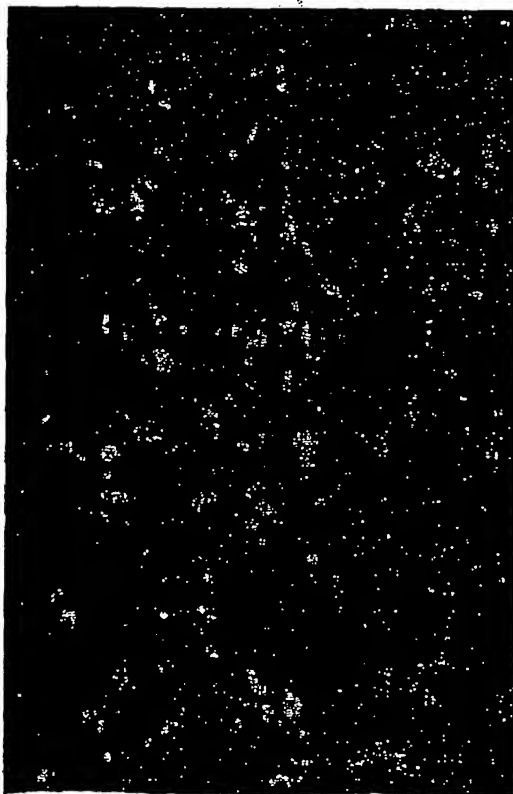
第4図



第 5 図

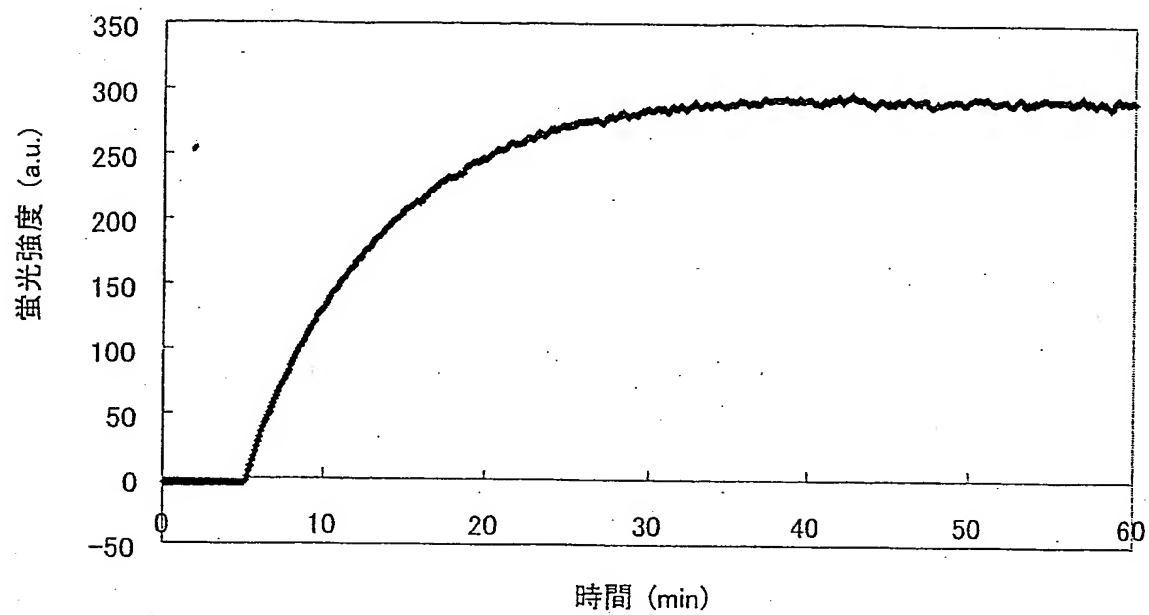


HEK293 / -lacZ

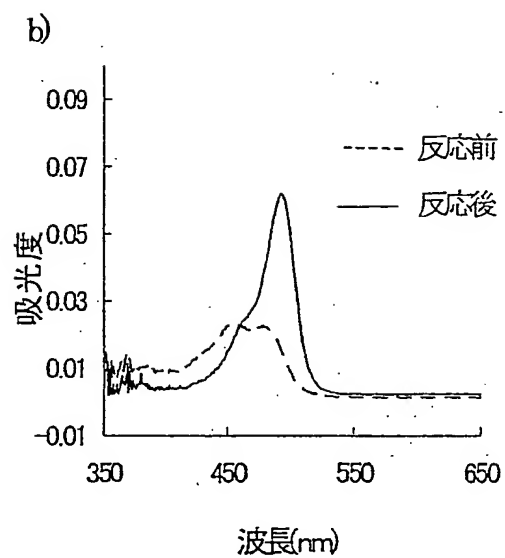
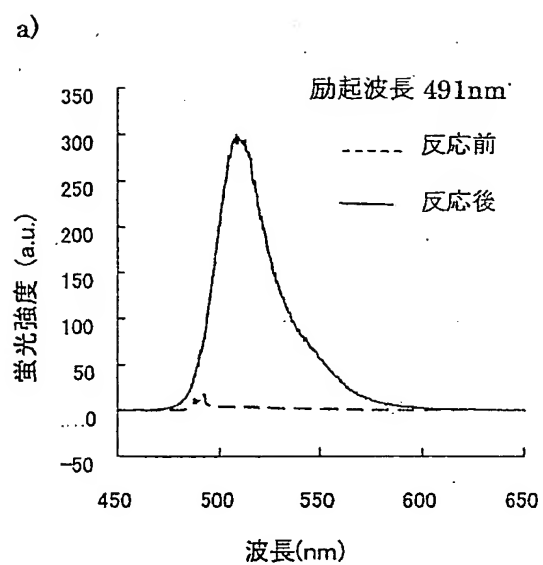


HEK293 / +lacZ

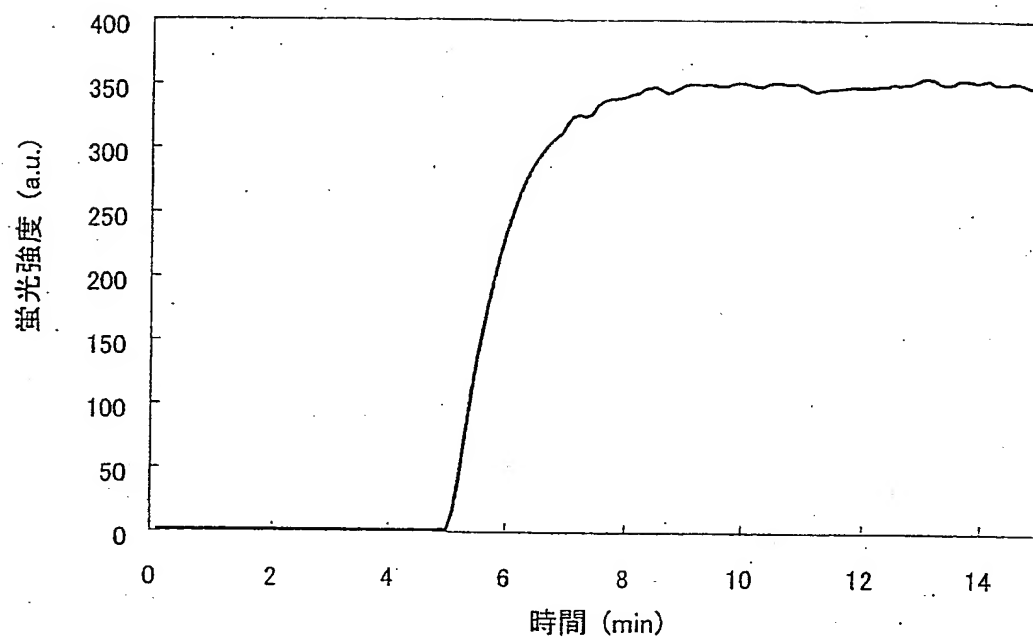
第 6 図



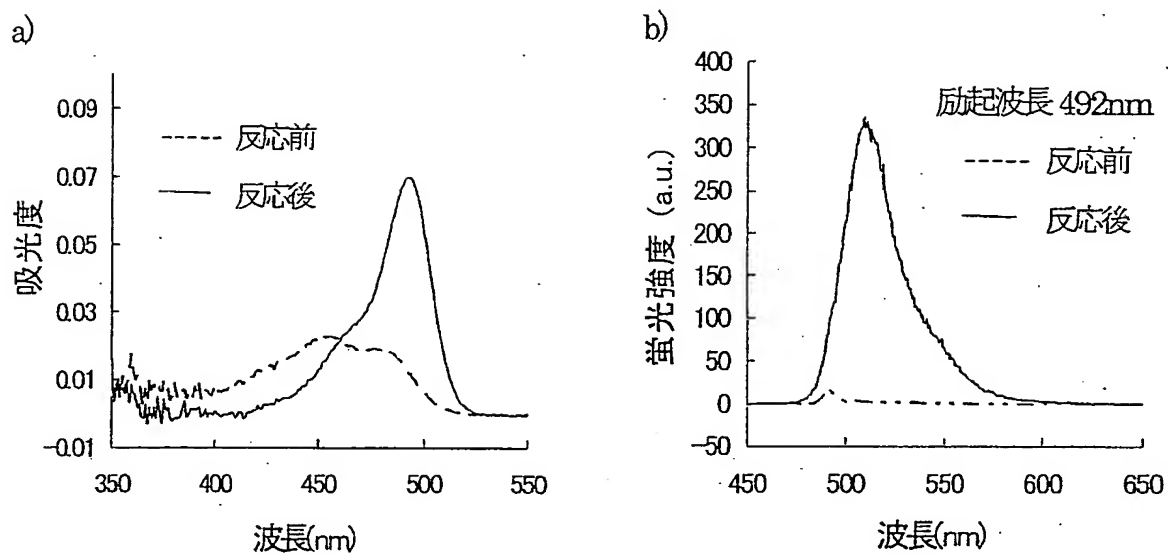
第7図



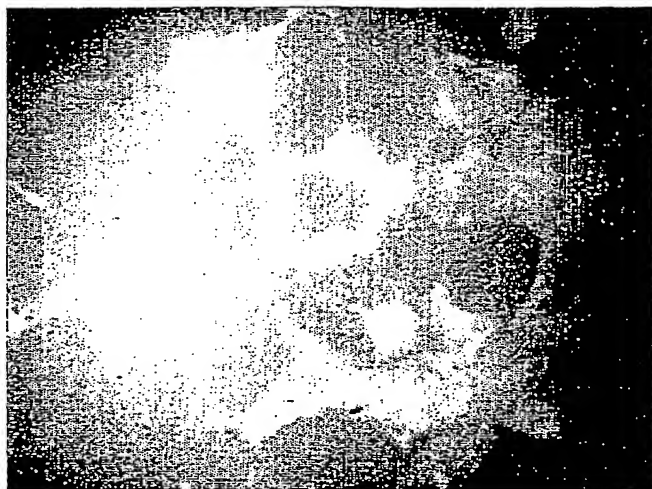
第 8 図



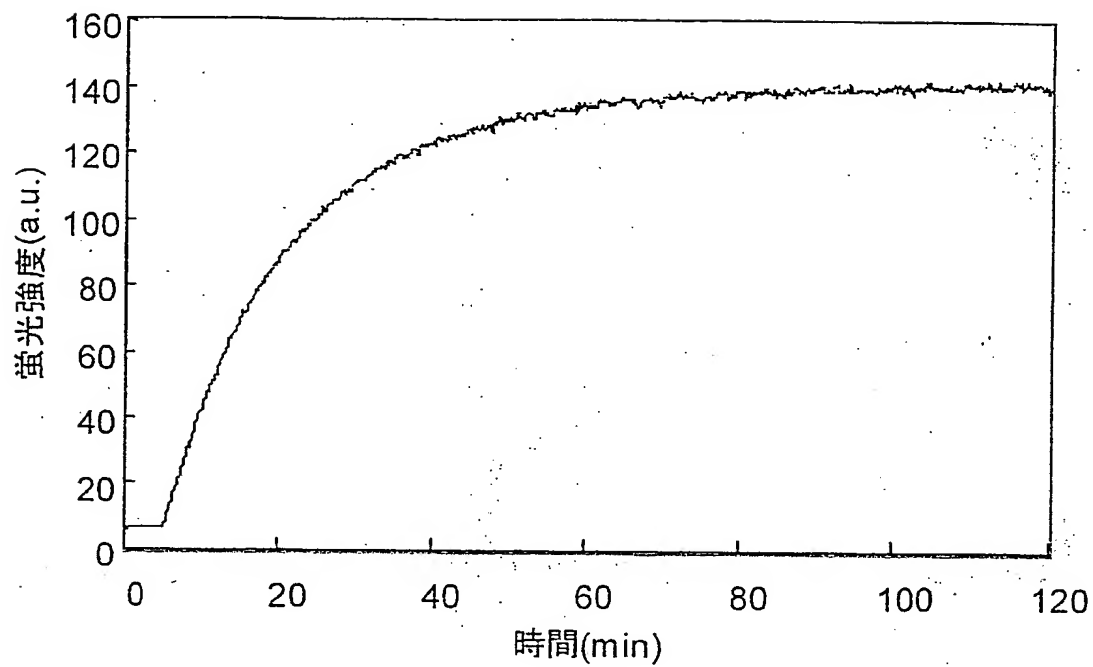
第 9 図



第 10 図



第 11 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013185

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/34//G01N21/64, 21/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-70

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DD 295855 A (FORCCH BIOTECH GMBH.), 14 November, 1991 (14.11.91), (Family: none)	1-16
A	D. TADIC et al., Chiral prodyes. Ethers and esters of dihydrofluorescein. Part 1. Dibenzylidihydrofluorescein (DBDF) a new reagent, Heterocycles, 1990, 31(11), p.1975-82	1-16
A	WO 2001/062755 A1 (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.), 30 August, 2001 (30.08.01), & US 2003/0162298 A1	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 October, 2004 (18.10.04)Date of mailing of the international search report
02 November, 2004 (02.11.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013185

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-4 and part of 7-16
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See extra sheet.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/013185

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

Claims 1-4 and 7-16

The "fluorescent probe" of the claims is unclear as to what specific structures R^1 and R^2 have in the compound. Consequently, the claims are not considered to be clearly described.

Furthermore, with respect to the "fluorescent probe," it is unclear as to what compounds the term includes besides the compounds in which combinations of R^1 and R^2 are shown in Examples, etc. Therefore, the subject matter of the claims is not considered to be sufficiently supported by the description and is not clearly and sufficiently disclosed in such a degree that persons skilled in the art can practice it.

Claims 1 and 15

It is unclear as to what degree the term "substantially" used in the claims means. Therefore, the claims are not be considered to be clearly described.

Incidentally, a search was not made for those subject matters which are not sufficiently supported by the description and are not clearly and sufficiently disclosed in the description:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12Q 1/34 // G01N 21/64, 21/78

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q 1/00-70

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
MEDLINE/BIOSIS/WPIDS/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	DD 295855 A (FORCCH BIOTECH GMBH) 1991. 11. 14 (ファミリーなし)	1-16
A	D. TADIC, et. al, Chiral prodyes. Ethers and esters of dihydrofluorescein. Part 1. Dibenzylidihydrofluorescein (DBDF) a new reagent, Heterocycles, 1990, 31 (11), p.1975-82	1-16
A	WO 2001/062755 A1 (第一化学薬品株式会社) 2001. 08. 30 & US 2003/0162298 A1	1-16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによつて進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 10. 2004

国際調査報告の発送日

02.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

4N

9286

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-4, 7-16の一部 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
特別ページ参照。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1-4、7-16

上記請求の範囲に係る「蛍光プローブ」は、 R^1 及び R^2 が、具体的にどのような構造を有する化合物であるか不明である。したがって、該請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

また、該「蛍光プローブ」について、実施例等で、 R^1 及び R^2 の組み合わせが示されている化合物以外に、どのような化合物が該当するか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に開示されていない。

請求の範囲1、15

上記請求の範囲における「実質的に」とは、どの程度であるか不明である。したがって、該請求の範囲は、明確に記載されているとはいえない。

なお、上記の如く、明細書に十分に裏付けられておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、調査を行っていない。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.